



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

GABRIEL HENRIQUE TAUFNER

**DESENVOLVIMENTO DE CORAÇÃO BIOARTIFICIAL A PARTIR DE
ARCABOUÇO DE MATRIZ DESCELULARIZADA E
CÁRDIOMIÓCITOS NEONATAIS**

VITÓRIA
2018

GABRIEL HENRIQUE TAUFNER

**DESENVOLVIMENTO DE CORAÇÃO BIOARTIFICIAL A PARTIR DE
ARCABOUÇO DE MATRIZ DESCELULARIZADA E
CÁRDIOMIÓCITOS NEONATAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira

VITÓRIA
2018

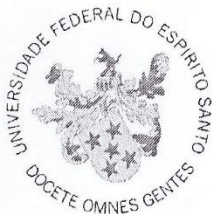
Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)
Bibliotecária: Perla Rodrigues Lôbo – CRB-6 ES-000527/O

T224d Taufner, Gabriel Henrique, 1994-
Desenvolvimento de coração bioartificial a partir de
arcabouço de matriz descelularizada e cardiomiócitos
neonatais / Gabriel Henrique Taufner. – 2018.
94 f. : il.

Orientador: Breno Valentim Nogueira.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Bioengenharia. 2. Tecidos (Anatomia e fisiologia). 3. Coração
artificial. I. Nogueira, Breno Valentim, 1979-. II. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**“DESENVOLVIMENTO DE CORAÇÃO BIOARTIFICIAL A PARTIR DE
ARCABOUÇO DE MATRIZ DESCELULARIZADA E CARDIOMIÓCITOS
NEONATAIS”**

Gabriel Henrique Taufner

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado por:

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira (UFES)
Orientador

Profa. Dra. Sônia Alves Gouveia (UFES)
Membro Interno

Prof. Dr. José Geraldo Mill (UFES)
Membro Interno

Prof. Dr. Marcelo Perim Baldo (UNIMONTES)
Membro Externo

Vitória-ES, 06 de março de 2018.

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos a Deus por acompanhar todos os meus passos durante os dois anos de mestrado.

Agradeço a minha família, especialmente minha avó Ivonete, *in memoriam*, que foi minha maior incentivadora desde os tempos de ensino primário. A minha mãe Gizella e meu padrasto Maykel por me apoiarem do início ao fim e por terem segurado a barra em situações difíceis.

A Wanderleia, que junto de minha família foram meus maiores incentivadores nesse período.

Ao Professor Dr. Breno Valentim Nogueira pela oportunidade e orientação em todos os detalhes da pesquisa.

Agradeço aos colegas de laboratório, que em pouco tempo tornaram-se meus amigos. Especialmente Afrânio, Tadeu, Gabriela, Rodolpho, Fernanda e Bruno que estiveram me acompanhando de perto e auxiliaram em meus procedimentos experimentais. Meus sinceros agradecimentos a todos os colegas do dia-a-dia. Agradeço também aos técnicos-amigos Jairo, Sueli e Flávio. Ao Professor Dr. Marco Cesar Cunegundes pelo conhecimento compartilhado entre os alunos.

Aos amigos que a vida nos traz de volta. Obrigado, Lorena, pelas noites em claro.

Agradeço aos colegas do laboratório de Imunopatologia, Divan, Andrés e Caio pelas horas de apoio na realização de experimentos.

Ao Professor Dr. José Geraldo Mill por gentilmente permitir a realização de algumas experimentações em seu laboratório. Ao técnico Enildo Broetto pelas horas de apoio na realização de experimentos.

A UFES e ao programa de pós-graduação em biotecnologia pela oportunidade e o conhecimento adquirido.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES): edital número 006/2014 - universal - projeto individual de pesquisa (termo de outorga: 0606/2015) e edital CNPq/FAPES Nº 012/2014 (processo: nº0832/2015).

RESUMO

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte por doença no mundo. Estima-se que 50% dos pacientes acometidos por doenças cardíacas não respondem satisfatoriamente a abordagens terapêuticas necessitando de transplante cardíaco para a substituição do coração doente por um sadio. O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar estruturalmente e funcionalmente MEC descelularizada de coração neonatal de camundongo. Obtivemos MEC de camundongos neonatos através de abordagem descelularizante utilizando 0,2% de SDS, que foi capaz de remover 98,5% de DNA nativo. Demonstramos a manutenção de moléculas de ECM através de dosagens espectrofotométricas, marcações histoquímicas e imuno-histoquímicas. Observamos que a MEC descelularizada foi capaz de fornecer suporte para população celular utilizada para a recelularização, além disso, não foi capaz de induzir atividade inflamatória local quando transplantada em animais imunologicamente competentes, sugerindo que a descelularização foi eficaz em remover moléculas responsáveis por desencadear resposta imune do hospedeiro. MEC com idade de desenvolvimento neonatal pode fornecer informações valiosas em processos que dizem respeito a regeneração e reparação tecidual, visto que algumas moléculas possuem intensa atividade neste período, ao contrário do que fora observado anteriormente em tecidos relativamente de maior idade.

Palavras-chave: Coração neonatal; Descelularização-Recelularização; *Scaffold*; Bioengenharia de tecidos.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in the world. It is estimated that 50% of patients with heart disease do not respond satisfactorily to therapeutic approaches and require a heart transplant to replace the diseased heart with a healthy one. The objective of this work was to obtain and characterize structurally and functionally MEC decellularized from neonatal mouse heart. We obtained MEC of neonatal mice through a decellularising approach using 0.2% SDS, which was able to remove 98.5% of native DNA. We demonstrate the maintenance of ECM molecules through spectrophotometric measurements, histochemical and immunohistochemical staining. We observed that the decellularized MEC was able to provide support to the cell population used for the recellularization, and was not able to induce inflammatory activity when transplanted into immunologically competent animals, suggesting that decellularization was effective in removing molecules responsible for triggering the immune response of host. MEC with a neonatal developmental age can provide valuable information in processes related to tissue regeneration and repair, since some molecules have intense activity in this period, contrary to what had previously been observed in relatively older tissues

Key words: Neonatal Heart; Decellularization-Recellularization; *Scaffold*; Bioengineering of tissues.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Dez principais causas de mortes no mundo em 2015	22
Figura 2 – Coração pré e pós descelularizado	45
Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura	46
Figura 4 – Coração nativo e descelularizado em meio de inclusão	47
Figura 5 – Área total cardíaca (mm ²)	47
Figura 6 – Concentração de DNA.....	49
Figura 7 – Coloração com Hematoxilina e Eosina.....	49
Figura 8 – Coloração com Picrosirius.....	50
Figura 9 – Colágeno isolado em imagens de 8 bits.....	50
Figura 10 – Colágeno (%/μm ²).	51
Figura 11 – Colágeno normalizado (%/μm ²).....	52
Figura 12 – Curva padrão de hidroxiprolina.	53
Figura 13 – Teor de hidroxoprolina em tecido nativo e descelularizado.....	53
Figura 14 – Microscopia Eletrônica de Transmissão	54
Figura 15 – Coloração com Alcian Blue pH 0,5.....	55
Figura 16 – GAG sulfatado isolado em imagens de 8 bit	55
Figura 17 – GAG sulfatado (%/μm ²)	56
Figura 18 – GAG sulfatado normalizado (%/μm ²).....	56
Figura 19 – Curva padrão de Sulfato de condroitina	57
Figura 20 – Teor de GAG sulfatado em tecido nativo e descelularizado.....	58
Figura 21 – Coloração com Alcian Blue pH 2,5	59
Figura 22 – GAG não sulfatado isolado em imagens de 8 bits.....	59
Figura 23 – GAG não sulfatado (%/μm ²)	60
Figura 24 – GAG não sulfatado normalizado (%/μm ²).....	60
Figura 25 – Coloração com PAS	61
Figura 26 – Marcação imunohistoquímica com anticorpo anti-fibronectina	62
Figura 27 – Curva padrão de SDS	62
Figura 28 – Detergente residual em controle positivo e tratado	63
Figura 29 – Histologia da ECM repovoada.....	64
Figura 30 – Histologia da ECM repovoada.....	64
Figura 31 – Células encontradas aderidas na placa contendo ECM repovoada	65
Figura 32 – Procedimento de SHAM realizado em orelha de camundongos.	66

Figura 33 – Implante de ECM realizado em orelha de camundongos	66
Figura 34 – Implante de ECM nativa realizado em orelha de camundongos	66
Figura 35 – Contagem de Leucócitos totais.	68
Figura 36 – Contagem de Neutrófilos.....	69
Figura 37 – Contagem de Linfócitos.....	70
Figura 38 – Análise Histológica utilizando HE	71
Figura 39 – Análise Histológica utilizando Picrossírius.....	74
Figura 40 – Análise Histológica utilizando Alcian blue pH 0,5	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade de animais utilizados	31
Tabela 2 – Dados de peso e quantidade de DNA	48
Tabela 3 – Dados de peso e quantidade de Hidroxiprolina	52
Tabela 4 – Dados de peso e quantidade de Sulfato de condroitina	57
Tabela 5 – Contagem total de leucócitos	68
Tabela 6 – Contagem diferencial de neutrófilos	69
Tabela 7 – Contagem diferencial de linfócitos	69

LISTA DE SIGLAS

AH	Ácido Hialurônico
DAB	Diamino benzidina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetra-Acético
FN	Fibronectina
GAG	Glicosaminoglicano
GLP	Glicoproteína
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina e Eosina
MEC	Matriz Extracelular
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de varredura
NaCl	Cloreto de Sódio
PBS	Tampão fosfato de sódio (do inglês Phosphate Buffered Sodium Saline)
SDS	Docecil Sulfato de Sódio
SCO	Sulfato de Condroitina
TRIS	Trisaminometano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. O CORAÇÃO	15
1.1.1. Matriz Extracelular	16
1.1.1.1. Colágeno	18
1.1.1.2. Glicoproteínas	19
1.1.1.3. Glicosaminoglicanos.....	20
1.2. EPIDEMIOLOGIA	21
1.3. BIOENGENHARIA TECIDUAL.....	24
1.4. DESCELULARIZAÇÃO.....	25
1.5. RECELULARIZAÇÃO	26
2. JUSTIFICATIVA.....	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. OBJETIVO GERAL	30
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4. METODOLOGIA.....	31
4.1. ANIMAS EXPERIMENTAIS	31
4.2. EUTANÁSIA E PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	32
4.3. FIXAÇÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	32
4.4. DESCELULARIZAÇÃO.....	33
4.5. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL.....	33
4.6. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE RETRAÇÃO.....	34
4.7. DETERMINAÇÃO DE DNA RESIDUAL	34
4.8. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	35
4.9. ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DE COLÁGENO	36
4.10. ANÁLISE QUANTITATIVA DE HIDROXIPROLINA	36
4.11. ANÁLISE NANOESTRUTURAL.....	37

4.12.	ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DE GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS	38
4.13.	ANÁLISE QUANTITATIVA DE GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS	38
4.14.	ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DE GLICOSAMINOGLICANO NÃO SULFATADO	39
4.15.	ANÁLISE QUALITATIVA DE GLICOPROTEÍNAS	40
4.16.	ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE FIBRONECTINA	40
4.17.	DETERMINAÇÃO DE SDS RESIDUAL	41
4.18.	ISOLAMENTO CELULAR	42
4.19.	RECELULARIZAÇÃO	43
4.20.	TESTE DE BIOCOMPATIBILIDADE	43
4.21.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5.	RESULTADOS	45
5.1.	DESCELULARIZAÇÃO	45
5.2.	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL	46
5.3.	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE RETRAÇÃO	47
5.4.	DETERMINAÇÃO DE DNA RESÍDUO	48
5.5.	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	49
5.6.	ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DE COLÁGENO	50
5.7.	ANÁLISE QUANTITATIVA DE HIDROXIPROLINA	52
5.8.	ANÁLISE NANO ESTRUTURAL DE COLÁGENO	54
5.9.	ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DE GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS	54
5.10.	ANÁLISE QUANTITATIVA DE SULFATO DE CONDOITINA	56
5.11.	ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DE GLICOSAMINOGLICANO NÃO SULFATADO	58
5.12.	DETERMINAÇÃO DE SDS RESIDUAL	62
5.13.	ANÁLISE QUALITATIVA DE GLICOPROTEÍNAS	61
5.14.	ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE FIBRONECTINA	61
5.15.	ISOLAMENTO CELULAR E RECELULARIZAÇÃO	62
5.16.	TESTE DE IMUNOREATIVIDADE	66

6. DISCUSSÃO	74
7. CONCLUSÃO.....	83
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
9. ANEXOS.....	96

1. INTRODUÇÃO

1.1.O CORAÇÃO

O coração é um órgão muscular subdividido em quatro cavidades distintas: átrio esquerdo e direito; ventrículo esquerdo e direito. O lado direito do coração bombeia o sangue para os pulmões e o lado esquerdo bombeia para os órgãos periféricos. Entre o átrio e ventrículo direito existe uma estrutura denominada valva tricúspide e entre átrio e ventrículo esquerdo a valva bicúspide. Essas válvulas são responsáveis por evitar o refluxo de sangue dos ventrículos para os átrios durante a sístole (GUYTON; HALL, 2006). O tecido cardíaco é composto por numerosa população celular que desde o desenvolvimento embrionário é circundada por inúmeras moléculas proteicas e não proteicas que em conjunto formam uma estrutura denominada matriz extracelular (MEC) (DE ROBERTIS; HIB, 2004). A população celular presente no coração – cardiomiócitos, fibroblastos, células endoteliais, células de Purkinje e células marca-passo – são responsáveis por exercerem funções estruturais, elétricas e bioquímicas.

Os cardiomiócitos são células alongadas que dispõem-se em malha, dividindo-se e recombinando-se através de estruturas denominadas discos intercalares, que possuem em seu interior zônulas de adesão, junções comunicantes do tipo desmossomos – que permite a propagação de força entre uma célula – e do tipo gap – que conferem a propagação de pulsos elétricos através da difusão livre de íons entre células (GUYTON; HALL, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; LEONARD; SMAILL; LEGRICE, 2012; VALIENTE-ALANDI; SCHAFER; BLAXALL, 2016; VUNJAK-NOVAKOVIC et al., 2011; WINSLOW; WALKER; GREENSTEIN, 2016). A comunicação entre os cardiomiócitos torna o coração um grande sincício tridimensional, que estruturalmente é subdividido em dois: atrial e ventricular. Os átrios e ventrículos são separados por uma fina camada de tecido conjuntivo que circunda as aberturas das valvas atrioventriculares. A presença de uma camada fibrosa na divisão entre o leito atrial e ventricular atua como barreira impedindo a propagação de potencial de ação entre cardiomiócitos atriais e ventriculares. A propagação de potencial de ação nessa região é realizada exclusivamente pelas células Nodais, que propagam entre cardiomiócitos os feixes elétricos gerados por células marca-passo

proveniente do nó sinoatrial encontrado na região superior do átrio direito (XIN; OLSON; BASSEL-DUBY, 2013). As células mais abundantes no coração, os fibroblastos são responsáveis por secretar a grande maioria dos componentes proteicos e não proteicos de matriz extracelular (PALAZZOLO et al., 2016). Essas células desempenham um papel crítico na manutenção da função cardíaca normal, bem como no remodelamento cardíaco em condições patológicas tais como infarto do miocárdio e hipertensão arterial. Essas células possuem inúmeras funções, incluindo síntese e deposição de matriz extracelular, comunicação célula-célula com cardiomiócitos, sinalização para com outros fibroblastos, bem como com células endoteliais. As células musculares lisas estão presentes nas artérias coronárias e na vasculatura de entrada e saída do coração. As células endoteliais revestem o endocárdio, o interior dos vasos e as válvulas cardíacas (HSIEH et al., 2006).

Em estágio de desenvolvimento embrionário e pré-natal, o coração possui considerável capacidade mitótica, conferindo a ele nesse momento um crescimento somático. Quando em estágio final de desenvolvimento, a bomba cardíaca passa a apresentar crescimento expansivo e reduzida ocorrência de mitose (PORRELLO et al., 2011; PORRELLO; OLSON, 2014). No estágio de crescimento somático, o músculo cardíaco apresenta capacidade promissora de regeneração quando lesionado (PORRELLO et al., 2011). Os fenômenos regenerativos já foram descritos em hidra, crustáceos, vermes, moscas da fruta, sapos, salamandras, peixe zebra, roedores e humanos (PORRELLO; OLSON, 2014).

O processo de regeneração tecidual está em plena elucidação e já é de conhecimento que envolve uma série de interações entre matriz extracelular e células que resulta em uma diversidade de mecanismos celulares, incluindo recrutamento e ativação de células-tronco, bem como a desdiferenciação, trans-diferenciação e proliferação de tipos de células diferenciadas (POSS, 2010).

1.1.1. Matriz Extracelular

A matriz extracelular (ECM) é uma ampla rede macromolecular tridimensional composta por proteínas estruturais e funcionais dispostas em camadas que comportam e interligam células de forma justaposta (BROWN; BADYLAK, 2014; THEOCHARIS et al., 2016; VALIENTE-ALANDI; SCHAFER; BLAXALL, 2016). Ela é secretada principalmente por fibroblastos residentes, e atua definindo os limites do tecido, suas propriedades biomecânicas e a polaridade celular. Sendo assim, a composição e a ultraestrutura tridimensional estão altamente relacionadas com o fenótipo celular e as funções necessárias do tecido ou órgão do qual é derivado (BROWN et al., 2010; HUMPHREY; DUFRESNE; SCHWARTZ, 2014). Além disso, as matrizes extracelulares servem como substrato adesivo para a migração celular e, através da ligação de morfógenos e fatores de crescimento (HYNES, 2009). As proteínas da ECM fornecem sinais bioquímicos interpretados pelos receptores da superfície celular, como as integrinas e iniciam cascatas de sinalização que controlam a sobrevivência celular, a proliferação celular, a diferenciação e o estado das células estaminais (células tronco residentes no tecido) (CAMPBELL; HUMPHRIES, 2011; ROZARIO; DESIMONE, 2010; WICKSTRÖM; RADOVANAC; FÄSSLER, 2011).

Resumidamente, as principais classes moleculares que constituem a ECM são colágenos, glicoproteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2010; HE; CALLANAN, 2012; REMLINGER; WEARDEN; GILBERT, 2012; SOUZA; PINHAL, 2011; THEOCHARIS et al., 2016). Quantitativamente a presença de cada elemento é modulada de acordo com a necessidade do tecido e a sua idade de desenvolvimento. Entre um tecido e outro, é bastante comum observar significativa mudança composicional e organizacional em função de diversos fatores como idade de desenvolvimento, estado metabólico das células em resposta a mudanças nas propriedades mecânicas; níveis de pH; concentração de gases, e outras variáveis no microambiente (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2010; WILLIAMS et al., 2014). Vale ressaltar ainda que apesar de serem influenciadas diretamente por tais fatores, também são capazes de influenciar fenótipos, migração e adesão de células (BAKER; SOUTHGATE, 2008; BOUDREAU; MYERS; BISSELL, 1995; INGBER, 1991), evidenciando o estado de equilíbrio entre célula-matriz (BISSELL; HALL; PARRY, 1982). Por estas razões, arcabouços acelulares de ECM passaram a ser investigados como modelos indutivos para a reconstrução funcional de diversos tecidos e órgãos.

A ECM do coração é composta principalmente por colágeno (I, III, IV, V e VII), glicoproteínas (fibronectina e laminina) e glicosaminoglicanos (sulfato de heparan, sulfato de dermatan, sulfato de condroitina e ácido hialurônico). No tecido cardíaco a concentração de moléculas de matriz extracelular é extremamente variável e está relacionada diretamente com o estágio de desenvolvimento no qual encontra-se o indivíduo. No desenvolvimento embrionário e pré-natal é comum a observação de moléculas com capacidade de promover proliferação e adesão celular. No caminho inverso, em estágio adulto, predomina no microambiente extracelular moléculas que possuem por finalidade manter a homeostase tecidual (JESTY et al., 2012; POLIZZOTTI et al., 2017; PORRELLO et al., 2011; PORRELLO; OLSON, 2014; WILLIAMS et al., 2014).

1.1.1.1. Colágeno

O colágeno é o componente estrutural mais abundante da ECM (GILLIES et al., 2011). Foram relatados até o momento pelo menos 28 tipos que são sintetizados pelo mesênquima e por fibroblastos (GORDON; HAHN, 2010; ICARDO; COLVEE, 1995). No coração, diversos tipos de colágenos estão presentes no ambiente extracelular, os colágenos fibrilares (tipo I, III, V), colágeno formador de rede (tipo IV) e colágeno de ancoragem (tipo VII) (LOCKHART et al., 2011b; LONDONO; BADYLAK, 2015). As moléculas colágenas da classe fibrilar possuem estrutura imprescindível para a função estrutural e biomecânica do coração, possibilitando a contração e relaxamento do tecido (KADLER et al., 2007). O colágeno formador de rede, em conjunto com proteoglicanos e a glicoproteína laminina originam uma estrutura denominada membrana basal, cuja função está ligada diretamente a delimitação, sustentação e nutrição celular. A classe de ancoragem atua diretamente na estabilização da membrana basal. Embora o tipo fibrilar predomine em um organismo, ambas as classes proporcionam propriedades estruturais e funcionais essenciais, e ainda são de grande valor em outras funções, tais como migração celular, adesão, angiogênese, e no reparo e desenvolvimento de tecidos (KADLER et al., 2007).

1.1.1.2. Glicoproteínas

Além de colágeno, a ECM contém uma série de proteínas que tipicamente possuem múltiplos domínios, cada um com locais de ligação específicos para outras macromoléculas matriciais e para receptores na superfície das células. Essas proteínas, denominadas glicoproteínas contribuem diretamente para a organização do meio extracelular e as células nele residente. A primeira glicoproteína a ser profundamente caracterizada foi a fibronectina (FN), uma grande molécula sintetizada por fibroblastos residentes no tecido conjuntivo. A molécula de FN é a segunda mais abundante na ECM, sendo profundamente essencial em processos de sinalização, proliferação e adesão celular (LONDONO; BADYLAK, 2015). Essa molécula interage com as células através da ligação com proteínas integrais de membrana, denominadas integrinas. Além da interação com a população celular tecidual, a FN pode ainda estabelecer ligações com outras moléculas proteicas e não proteicas como colágeno e glicosaminoglicanos respectivamente.

Em estágios de desenvolvimento embrionário e pós-natal, no tecido cardíaco é bastante comum expressão elevada de FN, visto que essa molécula possui papel essencial na embriogênese atuando ativamente para que o tecido se desenvolva de forma homogênea e saudável (THEOCHARIS et al., 2015; WILLIAMS et al., 2014). Na contramão, na fase adulta de desenvolvimento a expressão de FN na ECM cardíaca é extremamente reduzida, visto que o coração nesse estágio naturalmente cresce expansivamente pois não possui a mesma proliferação celular observada em fases iniciais (WILLIAMS et al., 2014).

Outra glicoproteína de suma importância é a laminina. Ela está presente em todos os órgãos do corpo, compondo juntamente com colágeno tipo IV e (outro elemento da membrana) uma estrutura proteica denominada membrana basal. Essa estrutura exerce importante função estrutural, sustentando e comportando de forma organizada as células do tecido. Em estágios iniciais de desenvolvimento, a laminina ainda exerce função essencial, principalmente no que diz respeito a adesão e proliferação de células (LOCKHART et al., 2011b; LONDONO; BADYLAK, 2015).

1.1.1.3. Glicosaminoglicanos

Os glicosaminoglicanos (GAG), são heteropolissacarídeos formados por unidades repetidas de dissacarídeos que possuem sempre um açúcar aminado e sulfatado, ou um segundo açúcar não sulfatado sendo normalmente um ácido urônico (HUYNH et al., 2012; THEOCHARIS et al., 2016). Os GAGS são classificados de acordo com o tipo de açúcar presente em sua estrutura. A presença de um açúcar sulfatado, dão origem as moléculas de sulfato de condroitina, sulfato de dermatan, sulfato de heparan, além de sulfato de queratan. O açúcar não sulfatado está presente em apenas um tipo de GAG, o ácido hialurônico (LOCKHART et al., 2011a). As moléculas sulfatadas são encontradas na maioria das vezes ligadas covalentemente a um núcleo proteico para formar moléculas maiores denominadas de proteoglicanos, o que não ocorre com moléculas não sulfatadas (ALBERTS et al., 2008; THEOCHARIS et al., 2010).

A presença do grupamento sulfato e das carboxilas dos ácidos urônicos, tornam as moléculas de glicosaminoglicanos carregadas negativamente (ALBERTS et al., 2008; THEOCHARIS et al., 2016). As moléculas de GAG são as mais negativas que uma célula sintetiza. A junção de carga negativa com as cadeias de açúcar, que são, além de longas, bastante rígidas e hidrofílicas, fazem a GAG ocupar um enorme volume, e por conta da carga, atraem muitos cátions, especialmente o Na^+ e, conseqüentemente, mais água, funcionando como verdadeiras esponjas. A grande capacidade de retenção de água possibilita a formação de um gel altamente hidratado, que preenche a maior parte do espaço extracelular, fornecendo suporte mecânico para os tecidos e permitindo a difusão rápida de moléculas hidrossolúveis, bem como a migração celular (ALBERTS et al., 2008).

O ácido hialurônico (AH), é a principal molécula de GAG presente no coração em desenvolvimento. Após a sua síntese, a molécula se expande devido à presença de água e passa a ocupar um grande volume que poderá ser mais tarde ocupado para a formação de órgãos como coração e córnea. Além dessa função imprescindível, as moléculas de ácido hialurônico possuem importante papel na indução de quimiotaxia – migração celular. Com o desenvolvimento em plena expansão, essas moléculas

serão degradadas pela ação da hialuronidase secretada pelas próprias células atraídas (ALBERTS et al., 2008). Além do AH, são encontrados no coração outros três tipos de GAG: sulfato de condroitina, sulfato de dermatan e sulfato de heparina. O primeiro é abundante na região das válvulas cardíacas e no anel fibroso que separa os átrios dos ventrículos e não possui apenas papel estrutural. Ele é responsável por inúmeros processos relacionados a quimiotaxia celular. Os dois últimos são encontrados em menor porção (LOCKHART et al., 2011a).

1.2. EPIDEMIOLOGIA

As doenças cardíacas estão entre as maiores causas de morte no mundo (FIG. 1) (LU et al., 2013; OMS, 2017). As doenças cardiovasculares incluem doenças coronarianas, cerebrovasculares, congênitas do coração, reumáticas do coração, dentre outras. Diversos fatores comportamentais podem contribuir para o aumento do risco dessas doenças, como hábitos alimentares, tabaco, falta de atividade física, uso de álcool e outros. Além disso, algumas doenças como diabetes, hipertensão e hiperlipidemia também podem desencadear doenças cardiovasculares (SMITH, 2007; WU, 1999).

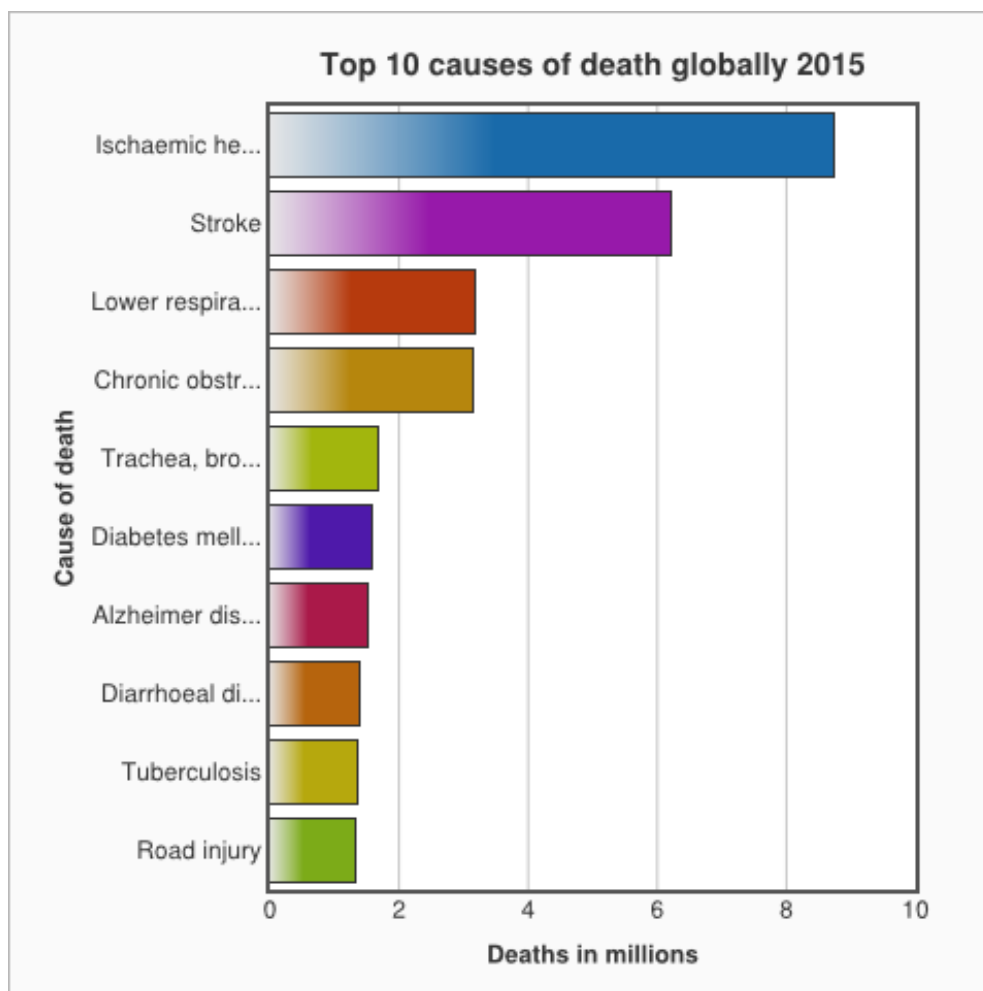


Figura 1 - As 10 principais causas de mortes no mundo em 2015. Fonte: (OMS, 2016).

O infarto agudo do miocárdio (IM) é um estado grave que pode levar a insuficiência cardíaca congestiva, reduzindo a capacidade de o coração bombear o sangue (INAMDAR; INAMDAR, 2016; MINICUCCI et al., 2011). Durante um evento de IM, o ambiente cardíaco é caracterizado por morte excessiva de cardiomiócitos e presença de sinais inflamatórios, que induzem o recrutamento de macrófagos cuja função é realizar a limpeza da área infartada (LONDONO; BADYLAK, 2015). Concomitante, fibroblastos proliferativos invadem a área e uma cicatriz colagenosa é formada para evitar a ruptura cardíaca (LISTER; RAYNER; SUURONEN, 2016). Em situações iniciais e menos severas, esta complicação é controlada com terapias medicamentosas, entretanto, quando há o agravamento, estas abordagens mesmo que otimizadas não atuam de forma satisfatória, reduzindo drasticamente a taxa de sobrevida dos pacientes (LU et al., 2013).

Para pacientes com grave redução da função cardíaca, a única opção é a substituição do órgão doente por um sadio, mas esse tratamento só é possível para um número limitado de pacientes devido à escassez de doadores (FUNAKOSHI et al., 2016). No ano de 2015, cerca de 32 mil brasileiros estavam cadastrados na lista de espera de transplantes, e desse total, 1.662 pacientes aguardavam ansiosamente pelo transplante cardíaco completo, entretanto, apenas 353 procedimentos foram realizados (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS, 2015). Seguindo a mesma linha, no ano de 2016 um número de 1.636 cardíacos estavam à espera de um órgão, mas apenas 357 receberam (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS, 2016).

Apesar de melhorar as taxas de sobrevivência a curto prazo, a longo prazo esse tratamento ainda possui limitações devido a rejeição ao órgão e aos efeitos da imunossupressão (GUYETTE et al., 2016). A II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco estabelece alguns critérios que vão desde o processo de seleção de potenciais receptores, até os cuidados em todas as fases após o transplante. Para seleção de receptores de coração são feitos vários testes que envolvem anamnese, testes físicos, testes de compatibilidade sanguínea, avaliação da gravidade da insuficiência, avaliação funcional de múltiplos órgãos, testes sorológicos, rastreamento de neoplasias além de consultas nutricionais, psicológicas/psiquiátricas. Os pacientes candidatos ao transplante recebem grandes quantidades de medicamentos antes mesmo da realização do transplante. Após transplantes o uso de imunossupressores se faz necessários devido à alta taxa de rejeição ao transplante, a utilização de corticosteroides, inibidores de calcineurina e anti-proliferativos ainda é usada de maneira rotineira. Mesmo com toda monitorização e utilização de medicamentos a rejeição ainda é muito comum, o que aumenta ainda mais os gastos com os pacientes transplantados (BACAL, 2009).

Por se tratar de um grave estado de saúde, novas abordagens terapêuticas estão sendo pensadas e desenvolvidas para suprir a necessidade de órgãos e os problemas causados pela rejeição, uma delas, é a descelularização e recelularização de órgãos, ferramentas de uma ciência complexa conhecida como bioengenharia tecidual.

1.3. BIOENGENHARIA TECIDUAL

A bioengenharia tecidual engloba uma série de aplicações metodológicas especificamente voltadas para a regeneração de tecidos lesados e/ou síntese de novos tecidos e órgãos (SKALAK; FOX, 1988).

O desenvolvimento de corações bioartificiais surge como uma solução promissora e futuramente viável para escassez de órgãos para transplantes, e para redução da rejeição sem a utilização de imunossupressores (GUYETTE et al., 2016). A redução das taxas de rejeição ao transplante poderia ser drasticamente reduzida com o uso de células derivadas dos próprios pacientes (GUYETTE et al., 2016). Nesse contexto, novas opções no campo da bioengenharia tecidual, como a utilização de suportes acelulares, têm sido exploradas para suprir essa necessidade por reparo tecidual ou por um novo órgão.

Com os avanços da bioengenharia tecidual já foram obtidos com sucesso vasos sanguíneos, bexiga urinária e traqueia, tecidos que não requerem uma grande rede vascular. Aplicações em órgãos como coração, rim, fígado e pulmão estão sendo realizadas, mas ainda são necessários estudos mais aprofundados, devido à rede vascular mais complexa presente nesses órgãos (ARENAS-HERRERA et al., 2013; GUYETTE et al., 2016; HOGAN et al., 2015; OTT et al., 2008). Em 2008 o primeiro órgão complexo foi descelularizado: corações de ratos foram perfundidos com agentes químicos e repovoados com células cardíacas neonatais, o órgão foi mantido em um biorreator em condições estéreis de cultura e após oito dias em cultura os corações mostraram respostas elétricas e contráteis (OTT et al., 2008). Anos mais tarde, estudos foram desenvolvidos utilizando como modelo experimental ratos adultos e neonatais (CREE CHAMBERLAND, ALMUDENA MARTINEZ-FERNANDEZ, ROSANNA BERALDI, 2014; LU et al., 2013; SILVA et al., 2016), camundongos neonatais (GARRY; KREN; GARRY, 2016), além de suínos (KITAHARA et al., 2016) e seres humanos (JOHNSON et al., 2016).

1.4. DESCELULARIZAÇÃO

A descelularização é o processo pelo qual as células são removidas dos tecidos/órgãos, e os componentes da ECM são mantidos em um suporte estrutural tridimensional (FU et al., 2014). A aplicação dessa técnica minimiza problemas de biocompatibilidade, tornando-a mais vantajosa em relação ao uso de matrizes sintéticas para o desenvolvimento de órgãos bioartificiais (LU et al., 2013). Descelularizar um órgão inteiro pode reduzir a concentração de moléculas imunologicamente ativas, além de preservar a estrutura tridimensional do órgão, incluindo o sistema microvascular primitivo, podendo ser utilizada na engenharia de tecidos (FU et al., 2014; HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY, 2013). Inúmeros métodos têm sido propostos e desenvolvidos para produzir um suporte acelular, porém todos os agentes usados alteram a composição e causam algum dano à ultraestrutura da MEC (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GRAUSS et al., 2005). Métodos químicos, físicos e biológicos estão sendo pesquisados com o objetivo de alcançar melhores resultados de remoção de células causando danos mínimo à matriz, e geralmente os processos mais eficazes no que se refere à remoção e preservação da MEC envolvem uma combinação desses métodos (HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY, 2013). Métodos preferidos de descelularização variam entre os tecidos e os órgãos devido a fatores específicos do tecido, tais como tamanho, espessura e forma, considerações de densidade celular e matriz. Uma das técnicas mais comuns é a imersão em uma solução de detergente com agitação mecânica para solubilizar as membranas celulares e dissociar o DNA e outros conteúdos celulares (WHITE et al., 2017).

Utilizados na descelularização, os detergentes são tipicamente não iônicos, iônicos ou zwitteriônicos. Os detergentes não iônicos, por exemplo, Triton X-100, perturbam as moléculas do DNA, lipídios e proteínas enquanto mantêm as estruturas de proteínas nativas (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Os detergentes iônicos, por exemplo, o dodecil sulfato de sódio (SDS) e o desoxicolato de sódio, solubilizam completamente as membranas nucleares e nucleônicas e desnaturam completamente algumas proteínas (KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015). Os detergentes zwitteriônicos, por exemplo, CHAPS, possui boa atividade no que diz respeito a manutenção de moléculas durante a descelularização, além de exibir propriedades

iônicas e não-iônicas (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Ainda que algum detergente possua reduzida capacidade lesar a ECM, ainda espera-se que possam ter algum efeito disruptivo durante o processo de descelularização (WHITE et al., 2017).

Uma combinação de agentes descelularizantes foram utilizados para descelularizar múltiplos tecidos e órgãos, incluindo tendão (YOUNGSTROM et al., 2013), esôfago (KEANE et al., 2013), traqueia (BAIGUERA et al., 2010), nervo periférico (KARABEKMEZ; DUYMAZ; MORAN, 2009), medula espinhal (GUO et al., 2010), válvulas cardíacas (CEBOTARI et al., 2010) e derme (REING et al., 2010). Recentemente, os detergentes foram aplicados para descelularização de órgãos inteiros através de método de perfusão em corações de ratos (OTT et al., 2008) e porcinos (KITAHARA et al., 2016), perfusão vascular nos pulmões (OTT et al., 2010) e perfusão através da veia porta no fígado (UYGUN et al., 2010).

OTT et. al. (2008) foram os primeiros a obterem ECM cardíaca descelularizada a partir de coração cadavérico de camundongos adultos. A partir de então, estudos acerca da descelularização cardíaca foram sendo realizados utilizando diversos modelos animais. Recentemente aventou-se a possibilidade que ECM neonatal, por possuir moléculas bioativas com capacidade de promover inúmeros processos celulares seria promissora se utilizada na reparação e reconstrução de um órgão (LOCKHART et al., 2011a; PORRELLO et al., 2011; PORRELLO; OLSON, 2014; WILLIAMS et al., 2014). GARRY et. al. (2016) recentemente obtiveram ECM acelular a partir de camundongos neonatais (GARRY; KREN; GARRY, 2016).

1.5. RECELULARIZAÇÃO

A recelularização de andaimes acelulares é considerada etapa crítica no desenvolvimento artificial de órgãos a partir da descelularização, visto que é nesta etapa que as células entram em contato íntimo com a ECM descelularizada. Basicamente, repovoar ECM acelular consiste em injetar populações celulares dentro do arcabouço descelularizado. As metodologias disponíveis para realizar tal

procedimento são a de semeadura por perfusão e injeção intramural (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2010; MOSER; OTT, 2014; OTT et al., 2008), sendo a escolha ideal baseada na anatomia e nas propriedades celulares de cada órgão (MOSER; OTT, 2014). Até o momento foram realizadas metodologia de perfusão em órgãos com conhecida vascularidade interna. A opção por injeções intramurais ocorre principalmente quando o tecido possui certa sensibilidade, ou não possui estrutura vascular preservada.

Ainda não é claramente elucidado os mecanismos pelos quais as células promovem a reconstrução do tecido (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2010), no entanto, para que ocorra a recelularização, é necessário seguir critérios pré estabelecidos. O primeiro diz respeito a pureza da ECM acelular, que deve conter ínfima quantidade de material genético e deve ser livre de antígenos, além disso, agentes químicos aplicados na descelularização são um fator agravante, sendo necessário a sua eliminação (MOSER; OTT, 2014). Outro critério essencial refere-se à integridade estrutural e composicional da ECM descelularizada. É sabido que o processo de remoção celular é capaz de degradar componentes essenciais para a homeostase tecidual. Para que ocorra bom repovoamento da ECM, a mesma deve estar estruturalmente viável e deve possuir a maior quantidade possível de moléculas de ECM. Um último critério, mas não menos importante, diz respeito ao suporte nutricional e gasoso para tecidos recelularizado. Para que ocorra a expansão em densidades desejáveis de células, conferir suporte nutricional e gasoso in vitro é essencial (OTT et al., 2008).

OTT et. al. (2008), propuseram recelularizar ECM de camundongos através de método por perfusão arterial retrógrada. A escolha baseou-se na hipótese de que o leito vascular mesmo descelularizado, estava íntegro e pronto para receber populações celulares (OTT et al., 2008). Em determinadas situações, a presença de leito vascular íntegro não impede que outro tipo de semeadura possa ser escolhido. KITAHARA et. al. (2016) recelularizaram ECM de suíno através de perfusão arterial e injeção intramural para atingir regiões menos prevalecidas pela perfusão (KITAHARA et al., 2016). No repovoamento em tecidos cuja rede vascular não é completamente preservada, a abordagem de escolha será exclusivamente métodos de semeadura direta, seja ela através de injeção intramural ou incubação com células em meio de

cultivo (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015; MOSER; OTT, 2014; SCHOPKA et al., 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Frente ao forte indício de que as moléculas presentes na MEC neonatal são potencialmente promissoras na regulação e indução de processos relacionados a adesão, diferenciação e proliferação celular, como já demonstrado anteriormente. A presente pesquisa propõe o desenvolvimento de coração bioartificial a partir matriz descelularizada obtida a partir de método pouco agressivo, para estudar suas características e identificar meios para otimizar os processos atuais de recelularização.

3. OBJETIVOS

3.1.OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de coração bioartificial a partir de arcabouço de matriz descelularizada e cardiomiócitos neonatais.

3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver método de descelularização que preserve a matriz extracelular de corações neonatais;
- Caracterizar elementos essenciais da matriz extracelular;
- Avaliar parâmetros que interferem no repovoamento celular;
- Avaliar o processo de recelularização na matriz cardíaca neonatal desenvolvida;
- Avaliar a ECM descelularizada quanto a sua capacidade de induzir atividade inflamatória quando transplantada para tecido subcutâneo.

4. METODOLOGIA

4.1. ANIMAS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 78 camundongos neonatais Swiss machos com 3 dias de idade, e 18 camundongos adultos Swiss fêmeas com 8 semanas de idade para os procedimentos descritos na tabela abaixo (TABELA 1). Estes animais foram mantidos no Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde, localizado no campus da UFES em Maruípe. Os animais foram mantidos em gaiolas em ambiente com regime de ciclo claro/escuro (12h/12h), com temperatura e umidade controladas, água e ração comercial para animais experimentais *ad libitum*.

Tabela 1 – Tabela descritiva de procedimentos e de quantidade de animais utilizados.

PROCEDIMENTO	NEONATAL		ADULTO (n=18)
	NATIVO (n=31)	DESCELULARIZADO (n=47)	
QUANTIFICAÇÃO DE DNA	5	5	-
QUANTIFICAÇÃO DE SDS RESÍDUAL	-	10	-
TESTE DE BIOCOMPATIBILIDADE	-	6	-
PROCEDIMENTO SHAM	-	-	6
PROCEDIMENTO IMPLANTE	-	-	6
PROCEDIMENTO IMPLANTE NATIVO	-	-	6
HISTOQUÍMICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA	5	5	-
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	3	3	-
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	3	3	-
DOSAGEM DE HIDROXIPROLINA	5	5	-
DOSAGEM DE SULFATO DE CONDROITINA	5	5	-
ISOLAMENTO CELULAR	5	-	-
RECELULARIZAÇÃO	-	5	-

A utilização dos animais foi realizada de acordo com normas estabelecidas por entidades científicas nacionais e internacionais. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA- UFES) sob número 042/2016. Após os experimentos os animais eutanasiados foram acondicionados em

sacola de plástico branco com a identificação de risco biológico. Os animais foram conservados em freezer a -20°C até a coleta da Prefeitura de Vitória.

4.2. EUTANÁSIA E PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os animais neonatais foram higienizados com álcool 70% e em seguida acondicionados em fluxo laminar estéril e eutanasiados através do método de decapitação seguida de esternotomia, que permite o acesso à cavidade torácica e consequentemente ao coração. Em seguida, com auxílio de pinças e tesouras estéreis os órgãos foram removidos da caixa torácica. Prosseguiu-se com a remoção de tecidos adjacentes para por fim, serem pesados em balança analítica (Bel Engineering®, Itália).

Os animais adultos foram previamente pesados e higienizados em etanol 70%. Foram administrados a eles 600 µL via intraperitoneal de solução anestésica contendo Ketamina (Quetamina®, Vetnil) Xilazina (Rompun®, Bayer) 9:2 diluída em solução salina. Em fluxo laminar, os animais foram posicionados confortavelmente. Os pelos da orelha foram raspados. Novamente, foram higienizados em etanol 70%. Foi realizada uma incisão na base da orelha para a formação de um “bolso” intradérmico. Após o procedimento, os animais foram higienizados com álcool 70% e solução de Iodo.

4.3. FIXAÇÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Para a realizar análise histológica e imuno-histoquímica, os órgãos nativos (n=5), descelularizados (n=5) e repovoados (n=5) foram fixados em paraformaldeído à 4% tamponado com PBS por 24h. As amostras foram então acondicionadas em tubos microtubos de 2mL e desidratadas em etanol graduado – 70%, 80% e 95% – para em seguida embebidas por 12h a 4°C com 2mL de solução 1:1 de álcool 95% e historesina histológica 2-Hidroxietil Metacrilato (Jung, Germany). A solução foi removida e aos tubos foram adicionados 2mL de historesina pura e deixados por 24h a 4°C. Após o processo de inclusão o material foi acondicionado em formas plásticas e sob cada

amostra adicionamos 400 µL de historesina histológica suplementada com DMSO (Jung, Germany). A forma foi incubada por 24h em estufa a 37°C. Os blocos de resina confeccionados foram taqueados em madeira utilizando o meio de montagem JET (Clássico, Brasil). Foram realizados cortes histológicos de 5 µm de espessura para colorações histoquímicas e em 3 µm para imuno-histoquímica em micrótomo manual (Leica Biosystems, Germany). Os cortes foram capturados em lâminas comuns para realização de histoquímica, e em lâminas silanizadas (Graulab®) para imuno-histoquímica.

4.4. DESCELULARIZAÇÃO

A descelularização foi realizada a partir de uma abordagem química composta por soluções tampões, detergente e água destilada. Corações extraídos de camundongos neonatais após a eutanásia, foram imersos em tampão PBS pH 7,4 suplementado com heparina 0,1% (@Sigma Aldrich, USA) e agitados suavemente por 30 minutos para remoção de fluídos naturais como sangue e linfa. Em seguida, foram incubados em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) à 0,2% (@Sigma Aldrich, USA) por 48 horas em temperatura ambiente sob baixa rotação. Os órgãos descelularizados foram imersos novamente em tampão PBS pH 7,4 por 30 minutos para remoção de detritos e detergente. Por fim foram submetidos a 3 etapas de lavagem de 1 hora em água destilada.

4.5. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

Foi realizada Microscopia Eletrônica de Varredura em amostras nativas (n=3) e descelularizadas (n=3). As amostras foram fixadas em tampão Karnovsky (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 2%; tampão cacodilato 0,1M) por 24 horas. As amostras foram submetidas a três lavagens por 30 minutos em tampão cacodilato

0,1M pH 7,2 e em seguida pós-fixadas com mistura de Tetróxido e Ósmio (OsO_4) 1% e ferrocianeto de potássio 1,25% diluída em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 por uma hora em câmara escura a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram lavadas por 30 minutos com tampão cacodilato 0,1M e por 30 minutos com água destilada. Em seguida as amostras foram embebidas em crioprotetor glicerol e foram deixadas descansar *overnight*. As amostras cripreservadas foram mantidas em freezer -80°C (Panasonic®, Japão). Posteriormente com auxílio de duas pinças previamente resfriadas à -80°C , as amostras foram imersas em nitrogênio líquido e criofraturadas em pequenos pedaços. Prosseguiu-se com a desidratação em etanol crescente das amostras criofraturadas. Após desidratadas, foram secas em ponto crítico e em seguida montadas em *stubs* para realização de metalização com ouro em equipamento metalizador. As Imagens de ambos os grupos foram obtidas através de Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL JSM-6610LV).

4.6. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE RETRAÇÃO

Para determinar o valor de retração que a ECM descelularizada sofre durante o processo de descelularização, foram capturadas imagens com lupa (Leica® EZ4 HD) do momento final da inclusão em historesina. Com aumento de 16x, capturamos imagens de 4 posições distintas de órgãos nativos (n=7) e descelularizado (n=7). Utilizando o software Image J (National Institute of Health, USA), mensuramos a área total (mm^2) de todas as fotografias de ambos os grupos.

4.7. DETERMINAÇÃO DE DNA RESIDUAL

O DNA residual foi extraído utilizando proteinase K e isolado a partir de protocolo de extração salina descrito inicialmente na literatura (BRUFORD et al., 1992). Os corações nativos e descelularizados foram liofilizados e congelados em freezer -80°C (Panasonic®, Japão). As amostras foram alocadas em microtubos de 2mL estéreis

contendo solução de lise composta por 410 µL de *buffer* de extração (0,2 mL Tris 1M pH 8 / 0,4mL NaCl 5M / 0,4 mL EDTA 0,5M pH 8 / 19 mL de água ultrapura), 80 µL de SDS à 10% e 15 µL de proteinase K (20 µg/µL). Em seguida, os tubos foram encubados a 55°C *overnight*. Os tubos foram centrifugados a 13.700 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos e a eles adicionados 180 µL de NaCl 5M. Os microtubos foram homogeneizados até a formação de um precipitado de cor branca. Os tubos foram novamente centrifugados a 13.700 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente transferido para novos microtubos e foram adicionados 800 µL de isopropanol gelado. Os microtubos foram homogeneizados e em seguida novamente centrifugados a 13.700 RPM por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao tubo foram adicionados 250 µL de etanol a 80% e homogeneizados suavemente. Os microtubos foram novamente centrifugados e a eles adicionados novamente 250 µL de etanol a 80% e homogeneizados. A partir de então, os microtubos foram centrifugados a 13.700 RPM por 7 minutos, o sobrenadante foi descartado e o etanol residual foi evaporado à 55°C por 30 minutos em estufa estéril. O DNA contido nos tubos de material controle foi ressuspensão em 50 µL de água ultrapura, e o descelularizado em 25 µL. Os microtubos foram mantidos *overnight* à 4°C para diluição. Em seguida, procedeu-se com leitura em Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific®, USA).

4.8. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Lâminas de grupos controle, descelularizado e repovoado confeccionadas com secções de 5 µm foram submersas em hematoxilina de Harris por 1 minuto. Em seguida foram lavadas em água corrente por 10 minutos e imersos em eosina alcoólica por 10 minutos. Após a coloração, as lâminas foram submetidas à lavagem extensiva em água corrente e em seguida secas em estufa à 37° e montadas em DPX. Utilizando fotomicroscópio (Leica® ECC50 HD) obtivemos imagens de todos os grupos experimentais.

4.9. ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DE COLÁGENO

Lâminas de grupo controle e descelularizado confeccionadas com secções de 5 μm foram submersas em solução de ácido pícrico saturada com Direct Red 80 (Sigma Aldrich, USA) por 24h a 37°C. Em seguida, as lâminas foram submetidas a extensiva lavagem em água corrente. O conjunto de lâminas foram montados em meio DPX. Utilizando fotomicroscópio (Leica® ECC50 HD) obtivemos imagens de ambos os grupos experimentais. As fotografias obtidas foram analisadas no software Image J (National Institute of Health, USA) para mensurar o teor de cor por μm^2 em tecido nativo e descelularizado.

4.10. ANÁLISE QUANTITATIVA DE HIDROXIPROLINA

A determinação de hidroxiprolina foi realizada utilizando adaptação de protocolo espectrofotométrico descrito inicialmente na literatura (TORRE; LICHTIG; BERAQUET, 2004).

Para a determinação do aminoácido hidroxiprolina confeccionamos uma curva padrão de 10 pontos, partindo de uma solução contendo 2.600 $\mu\text{g/ml}$ de hidroxiprolina (Sigma Aldrich, USA). As diluições foram realizadas em microtubos de 2ml utilizando água destilada, onde o volume final foi de 100 μL (1:1). Os pontos da curva possuíam concentrações entre 2,5 e 1.300 μg de hidroxiprolina. De cada tubo, foram transferidos 50 μL do diluído para novos microtubos. Como branco foi utilizado 50 μL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 450 μL de solução de Cloramina T 0,025M cuja função é oxidar as moléculas de hidroxiprolina da solução. As amostras descansaram por 30 minutos e posteriormente foram adicionados 500 μL de reagente de Erlich 0,5M (de 4-dimetilaminobenzaldeído em uma solução de 2-propanol/ácido perclórico (2:1 v/v)). As amostras foram levadas ao banho maria à 60°C durante 15 minutos.

Triplicatas de amostras de tecido inteiro foram inicialmente acondicionados em tubos de 15 mL contendo 50 μL de NaOH 7N para hidrólise alcalina. Como branco, foi utilizado 50 μL de NaOH 7N que foi submetido a todas as etapas do processamento.

Os tubos foram autoclavados à 120°C ($p \approx 98,1 \text{ kPa}$) por 40 minutos. Posteriormente, foram adicionados aos tubos, 50 μL de H_2SO_4 3,5M para acidificar o hidrolisado. Neste momento, as amostras estavam em volume final de 100 μL . Deste volume, foram transferidos 50 μL para um microtubo. Foram adicionados a estes tubos e ao tubo branco 450 μL de Cloramina T 0,0025M. A solução reagiu por 25 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados aos tubos amostrais e branco, volume de 500 μL de reagente de Erlich 0,5M. A solução foi acondicionada em banho maria à 60°C por 15 minutos. As amostras de tecido e as amostras da curva padrão e seus respectivos brancos foram alíquotadas em microplaca de 96 poços e foram lidas em triplicata à absorbância de 560 nm em Espectrofotômetro leitor de placa (Varioskam Flash, Thermo Fisher).

4.11. ANÁLISE NANOESTRUTURAL

Foi realizada Microscopia Eletrônica de Transmissão em amostras nativas ($n=3$) e descelularizadas ($n=3$). As amostras foram fixadas em tampão Karnovsky (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 2%; tampão cacodilato 0,1M) por 24 horas. As amostras foram submetidas a três lavagens por 30 minutos em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 e em seguida pós-fixadas com mistura de Tetróxido e Ósmio (OsO_4) 1% e ferrocianeto de potássio 1,25% diluída em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 por uma hora em câmara escura a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram lavadas por 30 minutos com tampão cacodilato 0,1M e por 30 minutos com água destilada. As amostras foram desidratadas a temperatura ambiente em acetona crescente (30%, 50%, 70% e 100%).

Em seguida as amostras foram embebidas em solução de acetona/epon (2:1) por 6 horas, e posteriormente em proporção 1:1 overnight, e por último em proporção 1:2 por 6 horas. Em seguida as amostras foram embebidas em epon puro *overnight*. As amostras foram alocadas em formas de silicone apropriadas e sob elas adicionamos solução de epon puro. A forma foi mantida em estufa à 60°C por 48h. Foram realizadas secções ultrafinas de 70nm de espessura em ultramicrotomo (RMC Products®). Contrastamos as secções com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo 0,4%. As

amostras foram examinadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão à 80KV (JEOL, JEM-1400, USA, Inc.).

4.12. ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DE GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS

As soluções a serem utilizadas e as lâminas com secções de 5 μm foram ambientadas em temperatura de 65°C por no mínimo 30 minutos. As lâminas foram imersas em solução de ácido clorídrico 0,2N durante 30 minutos a 65°C, e em seguida foram incubadas também a 65°C em solução de Alcian blue 8GX 1% em ácido clorídrico 0,2N pH0,5 por 3 horas. Por fim, as lâminas foram imersas em água destilada a 65°C para remoção residual de corante. O conjunto de lâminas foram montados em meio DPX. Posteriormente, obtivemos imagens das lâminas de ambos os grupos utilizando fotomicroscópio (Leica® ECC50 HD). As fotografias foram analisadas no software Image J (National Institute of Health, USA), para mensurar o teor de cor por μm^2 em tecido nativo e descelularizado.

4.13. ANÁLISE QUANTITATIVA DE GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS

A determinação de sulfato de condroitina foi realizada utilizando uma adaptação do ensaio espectrofotométrico de Alcian Blue descrito anteriormente na literatura (KARLSSON; BJÖRNSSON, 2001; ZVAROVA et al., 2016).

Para a determinação da GAG sulfato de condroitina, foi confeccionada curva padrão de 8 pontos, partindo de solução contendo 800 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato de condroitina (Sigma Aldrich, USA). As diluições foram realizadas em microtubos de 2 mL utilizando água destilada, onde o volume final foi de 100 μL (1:1). Os pontos da curva possuíam concentrações entre 3,1 e 400 μg de sulfato de condroitina. De cada tubo, foram transferidos 50 μL do diluído para novos microtubos. Foram adicionados às alíquotas

dos padrões, as amostras em triplicata e ao branco (guanidina-HCl 8M), volume de 50 µL de solução de guanidina-HCl 8M. O volume final após a adição da guanidina-HCl foi de 100 µL. Aos tubos, foram adicionados 50 µL de SAT reagente (0.3% H₂SO₄/0.75% Triton X-100). Os microtubos descansaram por 15 minutos, e em seguida adicionou-se aos mesmos, 750 µL de reagente de Alcian Blue (Alcian blue 1%; H₂SO₄ 0.1%; guanidina – HCl 0.4 M), e posteriormente os tubos ficaram incubados *overnight* à 4°C. Em seguida foram centrifugados à 12.000g por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionamos em cada tubo 500 µL de DMSO para ressuspender o *pellet* e os mantivemos em agitação constante por 15 minutos. Posteriormente, centrifugamos novamente à 12.000g por 15 minutos e descartamos o sobrenadante. Por último, adicionamos 500 µL de reagente Gu-Prop-H₂O (Guanidina-HCl 4M; 1-propanol 33%; Triton 0.25%; Ficoll 0.1%) e ressuspendemos o *pellet*.

As amostras foram alíquotadas em placas de 96 poços e prosseguiu-se com leitura em triplicata a 605 nm em Espectrofotômetro leitor de placa (Varioskam Flash, Thermo Fisher).

4.14. ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DE GLICOSAMINOGLICANO NÃO SULFATADO

As soluções a serem utilizadas e as lâminas com secções de 5 µm foram ambientadas em temperatura de 65°C por no mínimo 30 minutos. As lâminas foram imersas em solução de ácido acético 3% durante 1h a 65°C, e em seguida foram incubadas a 65°C em solução de Alcian blue 8GX 1% em ácido acético 3% pH2,5 por 24 horas. Por fim, as lâminas foram imersas em água destilada a 65°C para remoção residual de corante. O conjunto de lâminas foram secas em estufa a 37°C e montadas em meio DPX. Posteriormente, obtivemos imagens das lâminas de ambos os grupos utilizando fotomicroscópio (Leica® ECC50 HD). As fotografias foram analisadas no software Image J (National Institute of Health, USA), para mensurar o teor de cor por µm² em tecido nativo e descelularizado.

4.15. ANÁLISE QUALITATIVA DE GLICOPROTEINAS

Lâminas de grupo controle e descelularizado confeccionadas com secções de 5 µm foram submersas em solução de ácido periódico a 1% durante 30 minutos a 56°C. Em seguida foram lavadas em água corrente por 10 minutos. Após a lavagem, as lâminas foram incubadas em Reativo de Schiff por 20h à 4°C. Posteriormente, foram submetidas a extensiva lavagem em água corrente para remoção do excesso de reativo. O conjunto de lâminas foram montados em meio DPX. Utilizando fotomicroscópio (Leica® ECC50 HD) obtivemos imagens de ambos os grupos experimentais.

4.16. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE FIBRONECTINA

Em análise imuno-histoquímica, utilizamos anticorpo anti-fibronectina (AB2413, Abcam®) na diluição de 1:100. Inicialmente, lâminas de tecido controle (n=3) e tecido descelularizado (n=3) foram submetidas a processo de remoção de resina em banhos de Tolueno (20min), Xilol (20min) e Acetona (10min). Em seguida foram reidratados em banhos decrescentes de 5 minutos em álcool 95%, 70%, 50%, 30% e água destilada.

As lâminas foram acondicionadas em cuba de plástico contendo tampão citrato pH 6,0 (Spring Bioscience® Germany). O aparato contendo as lâminas foi levado ao micro-ondas por 15 minutos para processo denominado recuperação antigênica. Em seguida, resfriou-se a cuba à temperatura ambiente por 20 minutos e prosseguiu-se com 3 etapas de incubação de 5 minutos em tampão TRIS pH 7,4. As lâminas foram secas individualmente com papel de filtro e em seguida demarcou-se os cortes com caneta hidrofóbica (Sigma-Aldrich, USA). A etapa seguinte, denominada bloqueio de peroxidase endógena, foi realizada utilizando peróxido de hidrogênio em câmara úmida por 20 minutos à temperatura ambiente. Repetiu-se as etapas de incubação em TRIS pH 7,4 e posteriormente, em etapa denominada bloqueio de proteína, foi utilizado sob os cortes demarcados solução bloqueadora de proteínas inespecíficas

por 20 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente. Após a finalização da etapa de bloqueio, escoou-se o bloqueador das lâminas e adicionou-se sobre os cortes 40 µL de anticorpo primário anti-fibronectina (AB2413, Abcam®). As lâminas com anticorpo foram incubadas overnight em câmara úmida. Repetiu-se os banhos em TRIS pH 7,4 e em seguida adicionamos sob os cortes demarcados 50 µL de anticorpo secundário conjugado ao polímero HPR (Nichirei Biosciences Inc., Japão) diluído em concentração 1:100. Para a revelação da reação utilizamos o substrato DAB líquido (Spring Bioscience®, Germany.). Todas as lâminas foram lavadas em água corrente e desidratadas em álcool para posteriormente serem montadas em DPX.

4.17. DETERMINAÇÃO DE SDS RESIDUAL

A determinação de SDS residual foi realizada utilizando uma adaptação do ensaio de azul de metileno descrito anteriormente na literatura (ZVAROVA et al., 2016).

Inicialmente, foi confeccionada uma curva padrão de detergente a partir de uma solução de SDS a 0,5%. Foram transferidos 1 mL da solução de SDS a 0,5% para um tubo contendo 1 mL de azul de metileno a 0,0125%. A partir dessa solução, agora com concentração de SDS a 0,25%, foram realizadas diluições em 8 pontos distintos (0,0039% a 0,25%) e em seguida prosseguiu-se com a leitura das diluições em triplicata à 650nm em Espectrofotômetro.

Para a mensuração de SDS residual, dois grupos amostrais, controle positivo (n=5) e lavado (n=5) foram acondicionados individualmente em tubos Falcon® de 15 mL contendo 1 mL de água destilada, em seguida foram desintegradas em um aparelho de ultrassom (Branson®). Após o procedimento de lise tecidual, foram transferidos em triplicata 5 µL de cada amostra para microtubos de 2 mL, e em seguida foram pipetados igualmente em cada tubo, volume de 495 µL de solução de azul de metileno à 0,0125%. As amostras foram agitadas e em seguida deixadas em repouso por 30 minutos. Posteriormente foi adicionado 1 mL de clorofórmio (Sigma Aldrich®, USA) em cada microtubo. As amostras foram agitadas e deixadas descansar por 30

minutos. As amostras foram alíquotadas em cuba de quartzo para prosseguir com leitura de absorbância a 650 nm em espectrofotômetro.

4.18. ISOLAMENTO CELULAR

Para a obtenção de células para repovoamento de ECM descelularizada, nós reproduzimos protocolo descrito por FU et. al. (2006), que consiste na dissociação das células presentes no tecido nativo utilizando tripsina (FU et al., 2006). Utilizamos camundongos neonatais (n=5) com 3 dias de vida para a extração de células. Em fluxo laminar estéril, os camundongos foram eutanasiados por decapitação seguida de esternotomia ao longo do esterno. Os corações foram expostos a partir da caixa torácica, e ainda pulsando, os removemos com auxílio de uma pinça estéril e os acondicionamos em PBS estéril sob o gelo. Com bisturi estéril picotamos os corações em pequenos pedaços e transferimos para tubos de centrifuga de 50 mL contendo 500 µL de tripsina a 0,08% (®Sigma Aldrich, USA) e duas esferas magnéticas. Os tubos repousaram sob o gelo por 20 minutos, sendo agitados suavemente a cada 2 minutos. Em seguida, acondicionamos os tubos em banho maria à 37°C por 10 minutos, agitando-os suavemente a cada minuto. Aos tubos, foram adicionados 500 µL de meio de cultura DMEM (Gibco®, USA) suplementado com soro fetal bovino à 10% (Gibco®, USA) para inativação da tripsina. Transferimos a suspensão para tubos de 15 mL. Os tubos descansaram sob o gelo por alguns segundos e em seguida foram centrifugados à 1.000 RPM por 5 minutos em centrífuga (Hitachi®, Japão) a temperatura ambiente. Descartamos o sobrenadante e ressuspendemos o *pallet* em 2 mL de meio suplementado com SFB à 10%. Os tubos descansaram por 5 minutos e em seguida transferimos a ressuspensão para novos tubos de 15 mL excluindo possíveis precipitados no fundo. Novamente centrifugamos à 1.000 RPM por 5 minutos. Descartamos o sobrenadante e ressuspendemos as células em 200 µL de meio DMEM/SFB 10%. Retiramos alíquota de 10 µL e diluímos em proporção 1:3 em azul de metileno a 1% para realização de contagem em Câmara de Neubauer (Marienfeld®, Germany).

4.19. RECELULARIZAÇÃO

Realizamos o repovoamento de ECM descelularizada (n=5) utilizando método de injeção direta de suspensão celular já descrito anteriormente na literatura (KITAHARA et al., 2016). Com seringas de 1 mL e pinças estéreis, perfuramos a parede da ECM, removemos os êmbolos das seringas e adicionamos a elas 200 µL da suspensão celular ($2,4 \times 10^5$) obtida no isolamento. Realocamos os êmbolos e lentamente injetamos a suspensão celular. Acondicionamos as matrizes repovoadas em placas de cultura de 12 poços. Complementamos com 1 mL de meio de cultura e em seguida encubamos em câmara de CO₂ (Panasonic®, Japão). Prosseguimos com a substituição do meio de cultivo após 7 dias. O tecido repovoado foi mantido em cultura por 10 dias e em seguida foi submetido a processamento histológico.

4.20. TESTE DE BIOCOMPATIBILIDADE

Para avaliar a eficácia da descelularização e corroborar os resultados anteriores de DNA residual e SDS residual, foi realizado teste de compatibilidade *in vivo* da ECM descelularizada.

Em um primeiro momento, pré-definimos dois grupos de camundongos adultos fêmeas com 8 semanas de idade. O primeiro grupo foi denominado falso operado (n=6) e o segundo denominado implantado (n=6). Os camundongos foram anestesiados com Ketamina (Quetamina®, Vetnil) e Xilazina (Rompun®, Bayer) em concentração 9:2 diluída em solução salina a 0,9%.

Em seguida, no pré-operatório foram realizadas coleta de sangue periocular de todos os animais para contagem de leucócitos totais e para confecção de esfregaço sanguíneo para contagem diferencial. Após a coleta inicial os camundongos foram posicionados confortavelmente em fluxo laminar e prosseguiu-se com a raspagem de pelos da região basal da orelha direita. Com auxílio de gaze estéril e álcool 70% higienizamos a região alvo da cirurgia. Utilizando bisturi estéril para cada animal nós

realizamos uma incisão uniforme na base da orelha e com auxílio de uma pinça curva realizamos o descolamento da derme para posterior formação de uma cavidade intradérmica. No grupo falso operado, após a formação da cavidade o local da cirurgia foi higienizado com álcool 70%. No grupo teste, com o auxílio de pipeta pasteur estéril adaptada nós acondicionamos a ECM de coração descelularizado no interior da cavidade intradérmica. Higienizamos a região da incisão utilizando álcool 70% e álcool iodado.

Prosseguimos com coleta de sangue a cada sete dias até o vigésimo oitavo dia após a cirurgia, totalizando 5 coletas juntamente com o pré-operatório. A partir do sangue colhido em todas as fases, confeccionamos esfregaços sanguíneos e realizamos a contagem total de leucócitos diluindo uma alíquota do sangue em diluição 1/20 em reagente de Turk, (20µL de sangue e 380µL de reagente de Turk). A partir da diluição realizada, alíquotas foram adicionadas em Câmara de Neubauer (Marienfeld®, Germany) e em microscópio óptico (Leica® ECC50 HD) prosseguiu-se com a contagem de leucócitos por quadrante. Para mensuração da quantidade global de leucócitos, nós utilizamos a seguinte fórmula: *Leucócitos Totais por µL de sangue* =
$$\frac{LC \times 20 \times 10}{4}.$$

A contagem diferencial foi realizada a partir dos esfregaços sanguíneos confeccionados em cada momento de coleta. Utilizando microscópio óptico (Leica® ECC50 HD) e um contador diferencial de leucócitos realizou-se contagem de 100 leucócitos por lâmina, e o resultado de leucócitos diferenciais foi expresso em proporcionalidade em % para cada classe celular.

Ao fim do experimento foi realizada análise histológica do tecido dos grupos controle, Sham, implante e implante nativo. Para análise histoquímica foram utilizadas técnicas de HE, além de picrossírius e alcian blue pH 0,5.

4.21. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism Versão 7.0.1 (GraphPad software, Inc, USA, Versão Completa). Os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste *Shapiro-Wilk*. Todos os dados apresentaram-se dentro de uma distribuição Gaussiana (comparado ao teste de normalidade com $\alpha=0,05$). Foi aplicado o teste *t* de Student não pareado para comparação entre dois grupos independentes. Para análises intra-grupos aplicamos o teste ANOVA – duas vias com *post hoc* de *Sidak* para múltiplas comparações. As amostras entre os grupos foram consideradas significativas quando $*p<0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm EPM.

5. RESULTADOS

5.1. DESCELULARIZAÇÃO

Ao fim do processo de descelularização, é possível observar ao nível macroscópico a perda de material celular. O coração apresenta-se translúcido e permite a distinção das câmaras cardíacas (FIG. 2B), algo não observado no coração nativo (FIG. 2A).

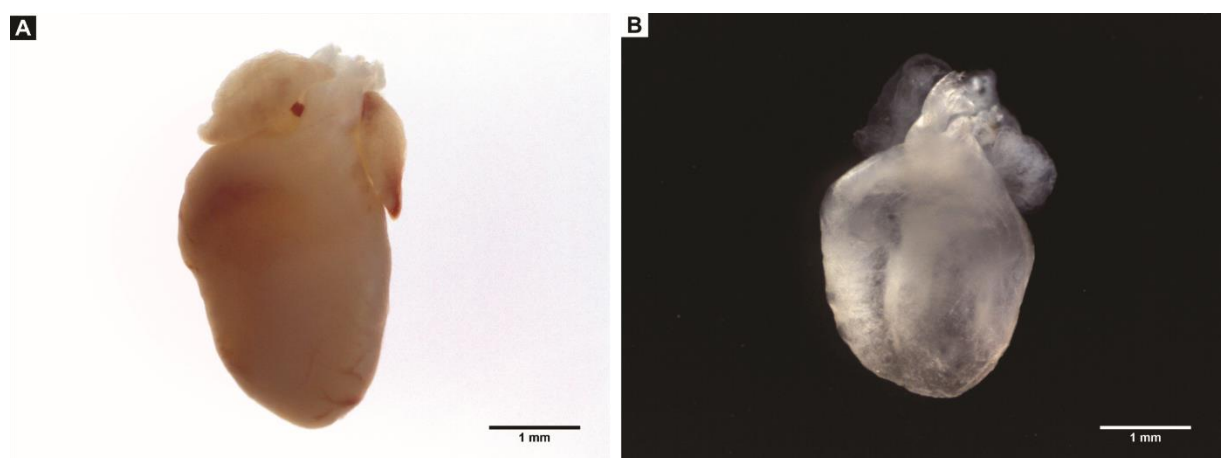


Figura 2 – Coração pré e pós descelularizado. Em A) observa-se o coração nativo contendo células. Em B) é possível observar o coração descelularizado nitidamente translúcido sem população celular aparente, e além disso nota-se a evidente redução de tamanho quando comparado com o nativo. Barra de escala – 1mm.

5.2. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

A microscopia eletrônica de varredura possibilitou a observação da microestrutura cardíaca nativa e descelularizada. No grupo controle (n=3), evidencia-se superficialmente conjuntos celulares, além de ECM entre as populações (FIG. 3A e 3C). No grupo descelularizado (n=3), podemos observar os arcabouços acelulares resultante do processo de descelularização (FIG. 3B e 3D).

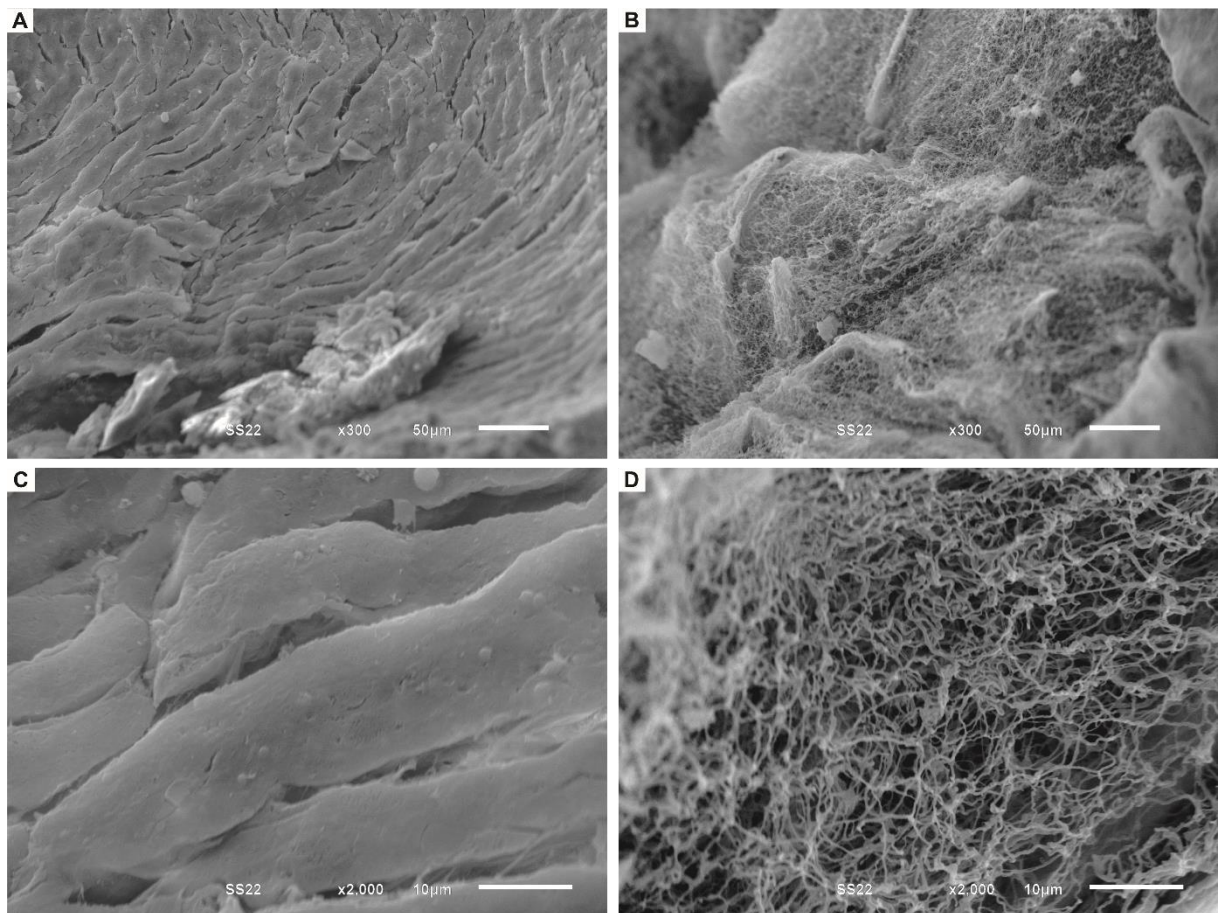


Figura 3 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura. Imagem A e C mostrando a organização das células cardíacas e das fibras da matriz extracelular, enquanto que na imagem B e D as fibras da matriz se mostram retraídas no arcabouço acelular no arcabouço acelular.

5.3.DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE RETRAÇÃO

Após a descélularização, observamos visualmente que o coração descélularizado (FIG. 4B) apresentou-se consideravelmente menor que o coração nativo (FIG. 4A).

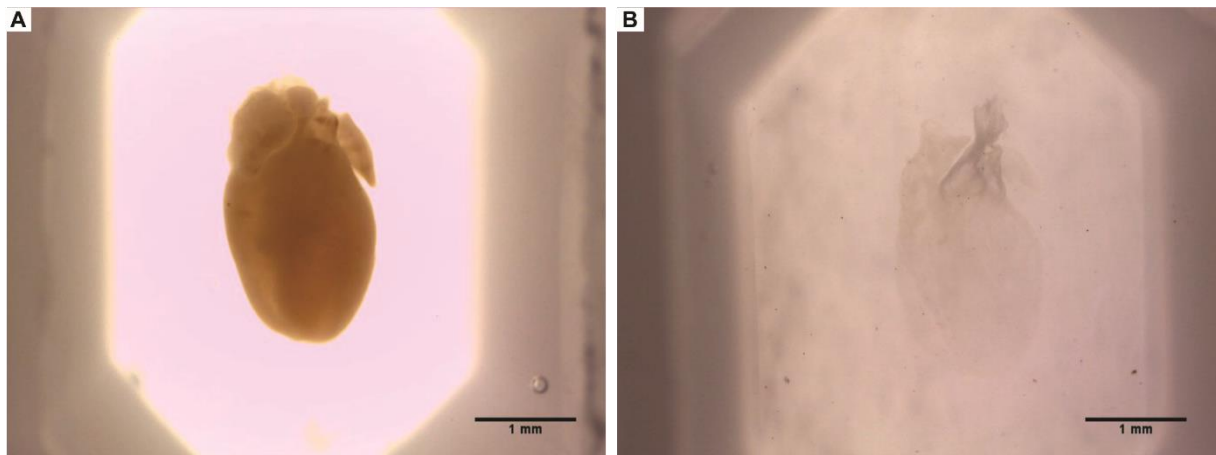


Figura 4 – Em A) observa-se o coração nativo. Em B) é possível observar o coração descélularizado e notar uma redução de tamanho quando comparado com o nativo. Barra de escala – 1mm.

O grupo nativo (n=7) apresentou tamanho médio de $19,47 \pm 0,82 \text{ mm}^2$, na contramão do grupo descélularizado (n=7), que demonstrou ser 26,7% menor com tamanho médio de $14,25 \pm 1,19 \text{ mm}^2$. Ao compararmos ambos os grupos, observamos diferença significativa (*p=0,0037) (FIG. 5).

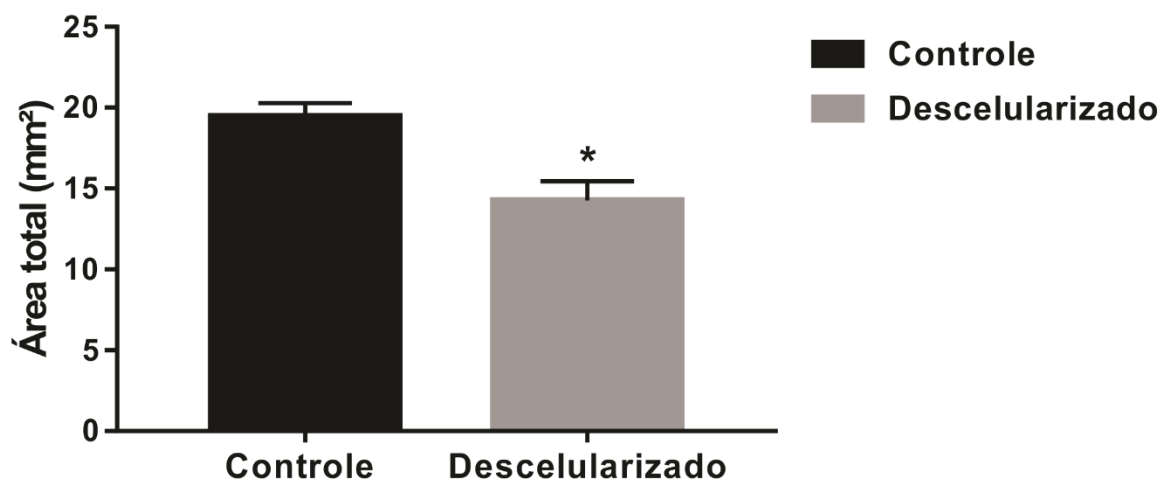


Figura 5 – Área total cardíaca em grupos controle (n=7) e descélularizado (n=7). Os dados estão expressos como média \pm EPM (*p< 0,0037, teste t de Student).

5.4. DETERMINAÇÃO DE DNA RESÍDUAL

Os animais utilizados em ambos os grupos não apresentaram diferença significativa quanto ao peso corpóreo ($p=0,90$). O mesmo aconteceu em comparação entre o peso dos órgãos ($p=0,66$). O grupo descclularizado apresentou peso maior no momento pós-descclularização devido a retenção de água. Quando comparado ao momento pré descclularização, no entanto, não houve diferença significativa ($p=0,33$).

Tabela 2 – Dados referentes a peso de animais, órgãos nativos e descclularizados, e quantidade de DNA encontrado em cada grupo.

	Controle (n=5)	Descclularizado (n=5)
Peso animal (g)	2,67 ± 0,16	2,70 ± 0,17
Peso de órgão nativo (mg)	15,30 ± 0,69	14,90 ± 0,56
Peso de órgão descclularizado (mg)	-	15,67 ± 0,50
Quantidade de DNA (µg/órgão)	61,19 ± 7,07	0,91 ± 0,06*

* $p < 0,0001$, teste *t* de Student

Observamos significativa redução de material genético em tecido descclularizado quando comparado ao nativo. Amostras de tecido descclularizado inteiro (n=5) apresentaram valor médio de 0,91 ± 0,06 µg de DNA. Na contramão, em amostras de tecido nativo inteiro (n=5) foi encontrado valor médio de 61,19 ± 7,07 µg de material genético. Comparando entre os grupos, encontramos redução significativa de aproximadamente 98,5% de material genético no tecido descclularizado (* $p = <0,0001$) (FIG. 6).

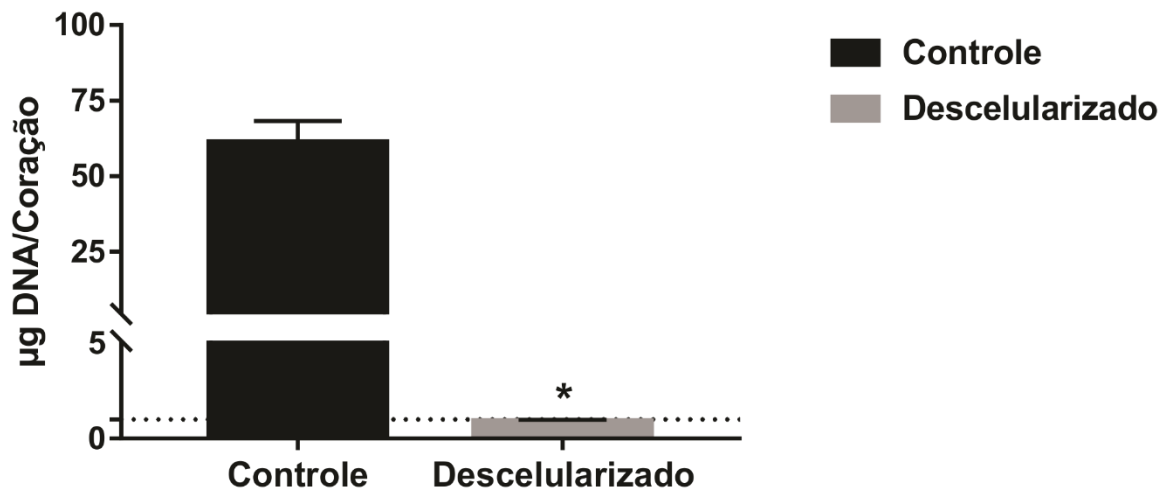


Figura 6 – Concentração de DNA em micograma por tecido inteiro dos grupos controle (n=5) e descelularizado (n=5). Foi realizada quebra de escala no eixo y. Os dados estão expressos como média \pm EPM; (* $p < 0,0001$, teste t de Student).

5.5. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

O método de coloração histoquímica de Hematoxilina e Eosina evidencia a presença de cardiomiócitos, fibroblastos e ECM no grupo nativo (FIG. 7A). Como esperado, após o processo de descelularização, a ECM foi exposta e observou-se a ausência de células e detritos (FIG. 7B).

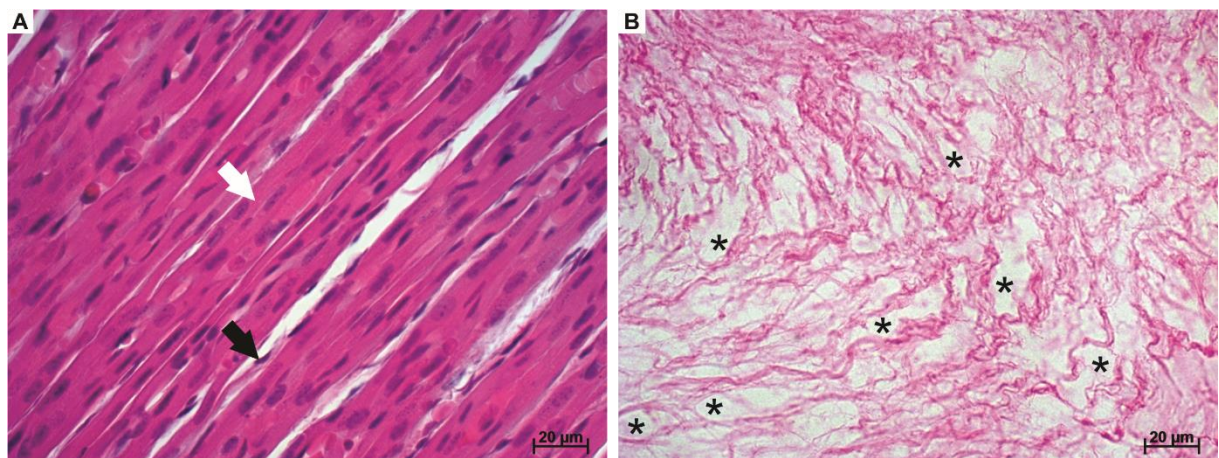


Figura 7 – Coloração com Hematoxilina e Eosina. Imagens de microscopia óptica dos grupos controle (A) e descelularizado (B). Barra de escala: 20 μ m

5.6. ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DE COLÁGENO

A coloração histoquímica por picrosirius evidenciou em vermelho o conteúdo de colágeno tipo I, e em amarelo as células e o restante da ECM. No grupo nativo, o colágeno encontra-se entre as células do coração (FIG. 8A). Após a descelularização o colágeno foi exposto e pôde ser evidenciado em diversos planos (FIG.8B).

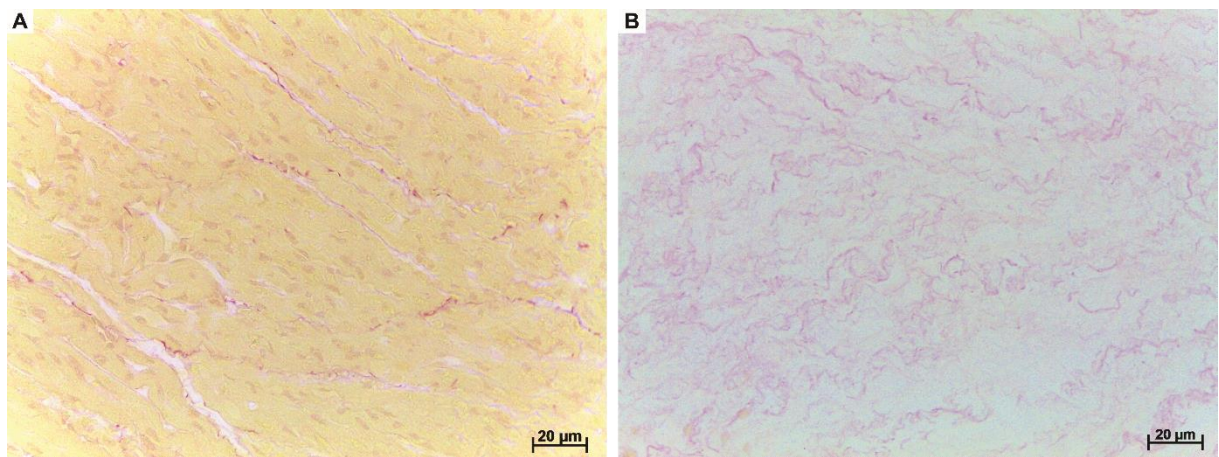


Figura 8 – Coloração com picrosirius. Imagens de microscopia óptica dos grupos controle (A) e descelularizado (B). Barra de escala: 20 µm

Este método histoquímico permitiu que a partir de imagens de colágeno isolado em 8 bit (FIG. 9A, e FIG. 9B) fosse realizada a mensuração do mesmo por fração de área.

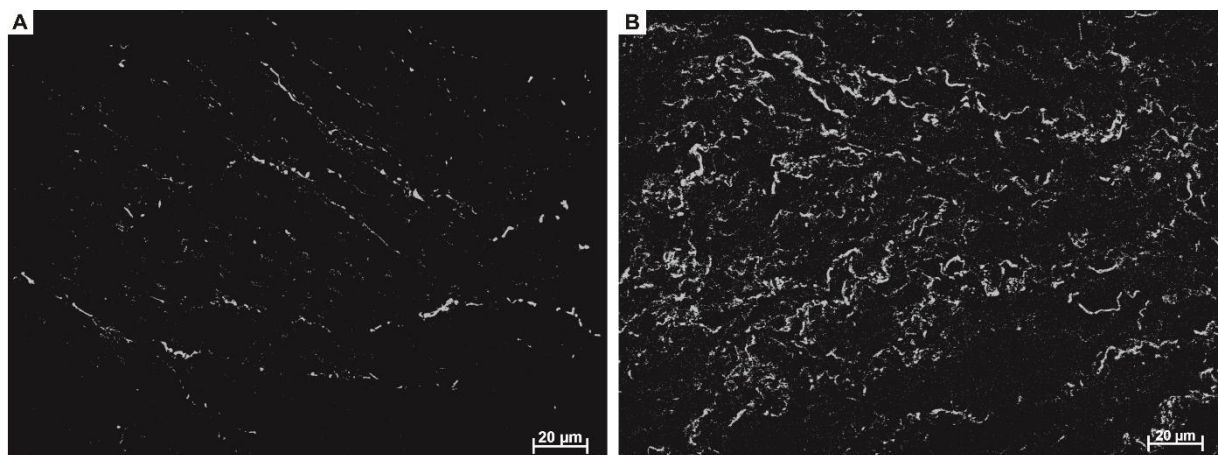


Figura 9 – Colágeno isolado em imagens de 8 bits. Imagens de microscopia óptica do grupo controle (A) e descelularizado (B). Barra de escala: 20 µm

A partir das imagens em 8 bit, em um primeiro momento após a descelularização, observou-se que o colágeno presente no tecido acelular era ligeiramente superior ao presente no tecido nativo ($7,71 \pm 0,23 \mu\text{m}$ contra $5,76 \pm 0,40 \mu\text{m}$; $p=0,0031$) (FIG. 10).

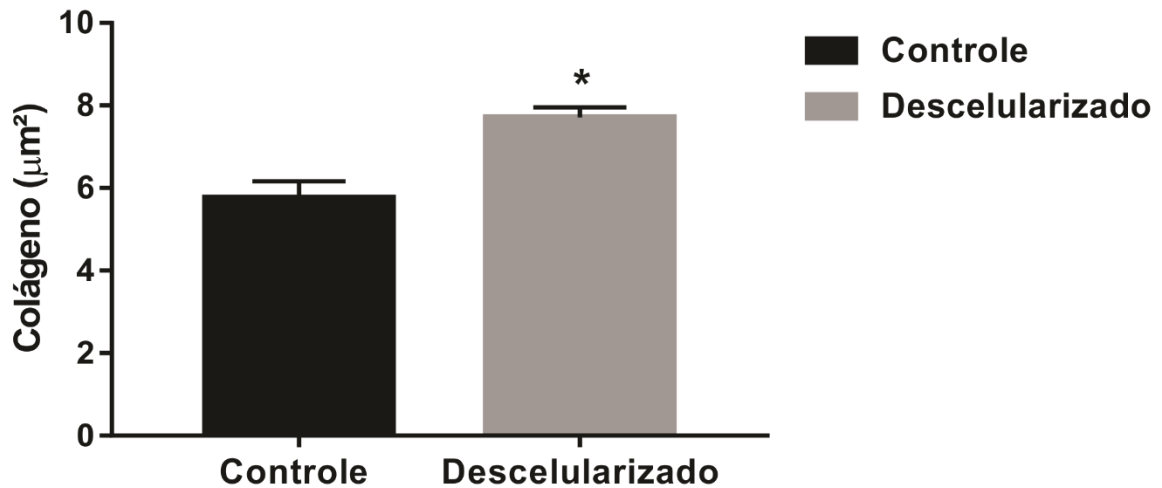


Figura 10 – Colágeno por μm^2 em grupos controle ($n=5$) e descelularizado ($n=5$). Os dados estão expressos como média \pm EPM; (* $p=0,0031$, teste t de Student).

O resultado foi normalizado com a aplicação do índice de retração tecidual no grupo descelularizado. Após a normalização observou-se a manutenção do colágeno quando comparado ao grupo nativo ($5,65 \pm 0,17 \mu\text{m}$ contra $5,76 \pm 0,40 \mu\text{m}$; $p=0,81$) (FIG. 11).

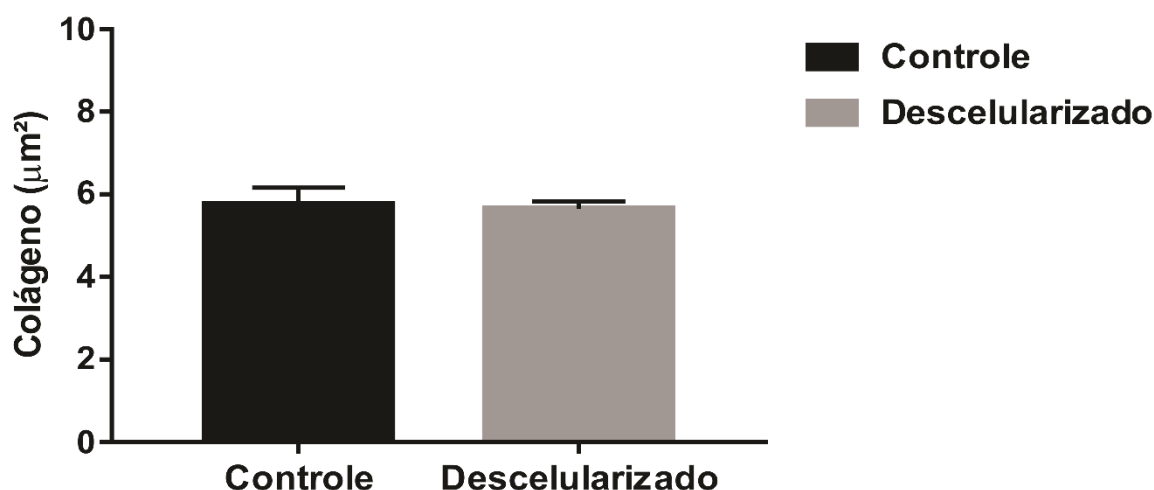


Figura 11 – Colágeno normalizado por μm^2 em grupos controle (n=5) e descelularizado (n=5). Os dados estão expressos como média \pm EPM; ($p=0,8128$, teste t de Student).

5.7. ANÁLISE QUANTITATIVA DE HIDROXIPROLINA

Os animais utilizados em ambos os grupos não apresentaram diferença significativa ($p=0,59$). O mesmo aconteceu em comparação entre órgãos ($p=0,91$). O grupo descelularizado apresentou peso semelhante no momento pós-descelularização quando comparado ao momento pré descelularização ($p=0,09$) (TABELA 3).

Tabela 3 – Dados referentes a peso de animais, órgãos nativos e descelularizados, e quantidade de hidroxiprolina encontrado em cada grupo

	Controle (n=5)	Descelularizado (n=5)
Peso animal (g)	$2,73 \pm 0,14$	$2,60 \pm 0,17$
Peso de órgão nativo (mg)	$14,86 \pm 0,42$	$14,92 \pm 0,39$
Peso de órgão descelularizado (mg)	-	$15,90 \pm 0,33$
Quantidade de hidroxiprolina ($\mu\text{g}/\text{órgão}$)	$295,6 \pm 36,06$	$317,8 \pm 43,16$

$p=0,70$ teste t de Student

A partir de curva padrão confeccionada com concentrações de hidroxiprolina entre 2,5 e 1.300 μg ($R=0,997$) (FIG. 12), foram mensurados o teor do aminoácido presente em amostras de grupos controle e descelularizado.

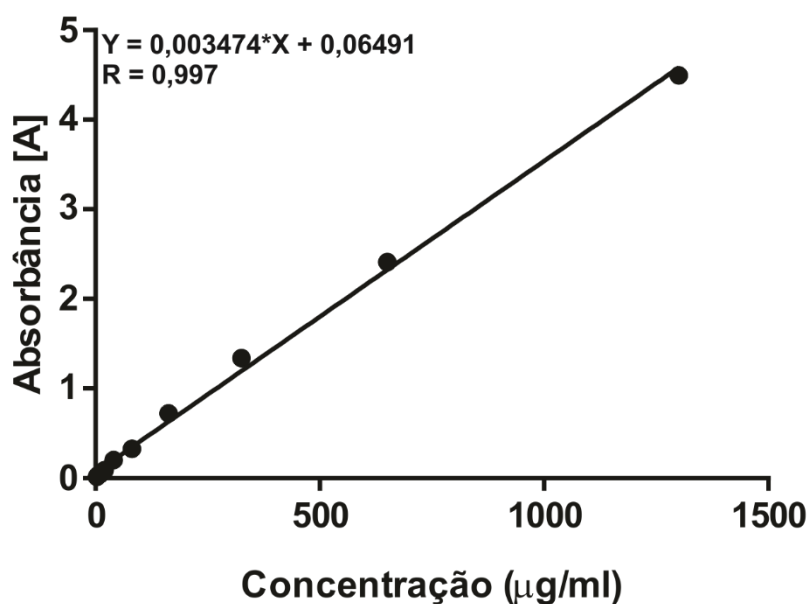


Figura 12 – Curva padrão de hidroxiprolina confeccionada com concentrações entre 2,5 e 1300 µg. $R = 0,997$.

O grupo controle ($n=5$) apresentou valor médio de $295,6 \pm 36$ µg de hidroxiprolina/órgão, valor próximo ao encontrado no grupo descelularizado ($n=5$), cuja média foi $317,8 \pm 43,1$ µg/órgão. Ao compararmos o teor em ambos os grupos, observamos que não houve diferença significativa ($p=0,70$) (FIG 13).

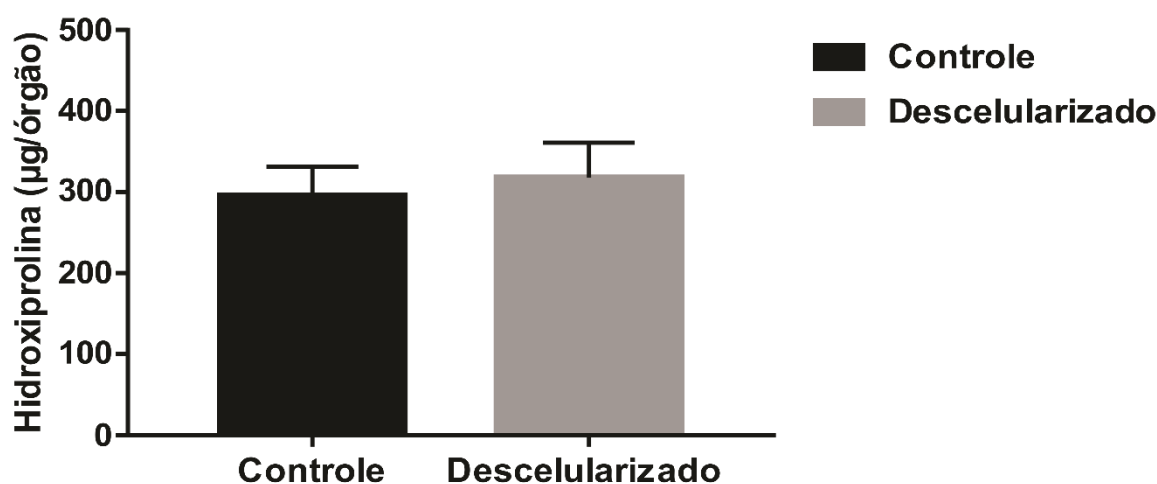


Figura 13 – Concentração de hidroxiprolina por tecido inteiro em grupos controle ($n=5$) e descelularizado ($n=5$). Os dados estão expressos como média \pm EPM; ($p=0,70$ teste t de Student).

5.8. ANÁLISE NANO ESTRUTURAL DE COLÁGENO

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão evidenciam os sarcômeros e mitocôndrias no grupo controle (FIG. 14A). No grupo descelularizado é evidente a presença de moléculas de colágeno, além disso, nota-se ausência de núcleos e detritos celulares (FIG. 14B).

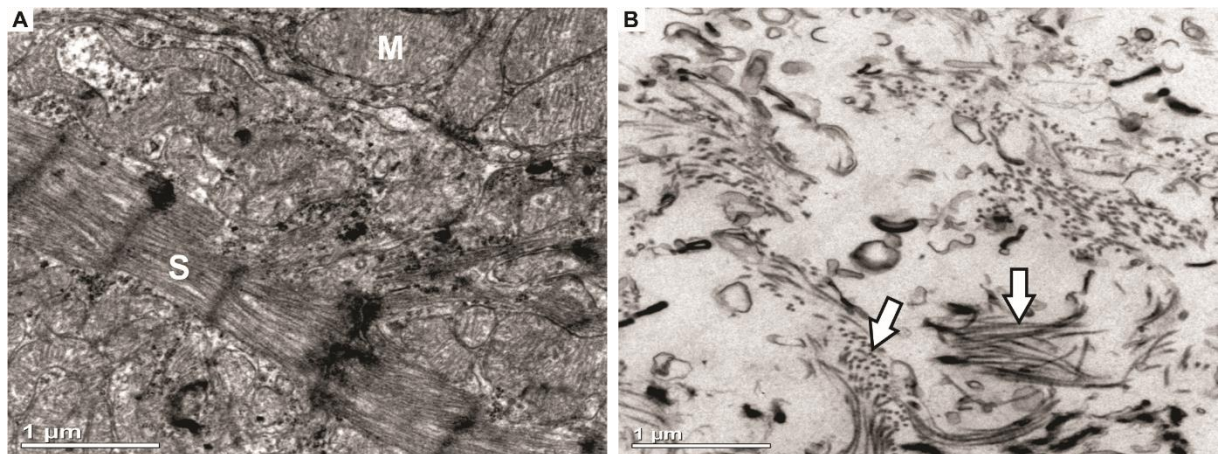


Figura 14 – Microscopia Eletrônica de Transmissão. Imagem A) demonstra o tecido nativo (n=3) e em evidência os sarcômeros (S) e mitocôndrias (M). Em B), no tecido descelularizado (n=3) é possível avaliar qualitativamente a presença de fibras colágenas.

5.9. ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DE GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS

A coloração histoquímica pelo método de Alcian blue pH 0,5 foi capaz de evidenciar em cor azul todo o conteúdo de glicosaminoglicanos sulfatados e em amarelo-esverdeado as células e o restante da ECM (FIG. 15A). No tecido descelularizado (FIG. 15B) os glicosaminoglicanos são evidentes em diversos níveis de observação.

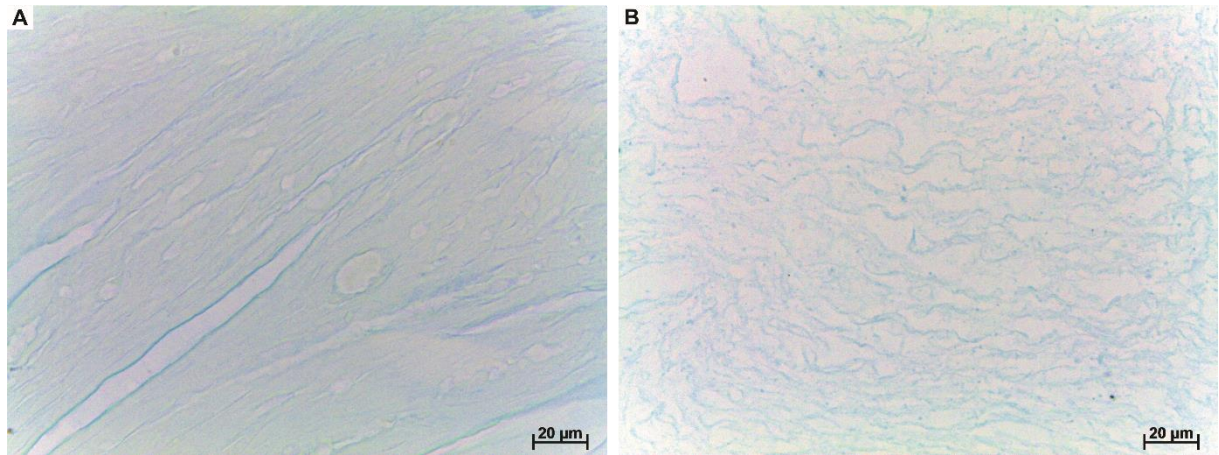


Figura 15 – Coloração com Alcian Blue pH 0,5. Imagens de microscopia óptica dos grupos controle (A) e descelularizado (B). Barra de escala: 20 µm

Este método histoquímico permitiu que a partir de imagens de GAG sulfatado isolado em 8 bit (FIG. 16A, e FIG. 16B) fosse realizada a mensuração do mesmo por fração de área.

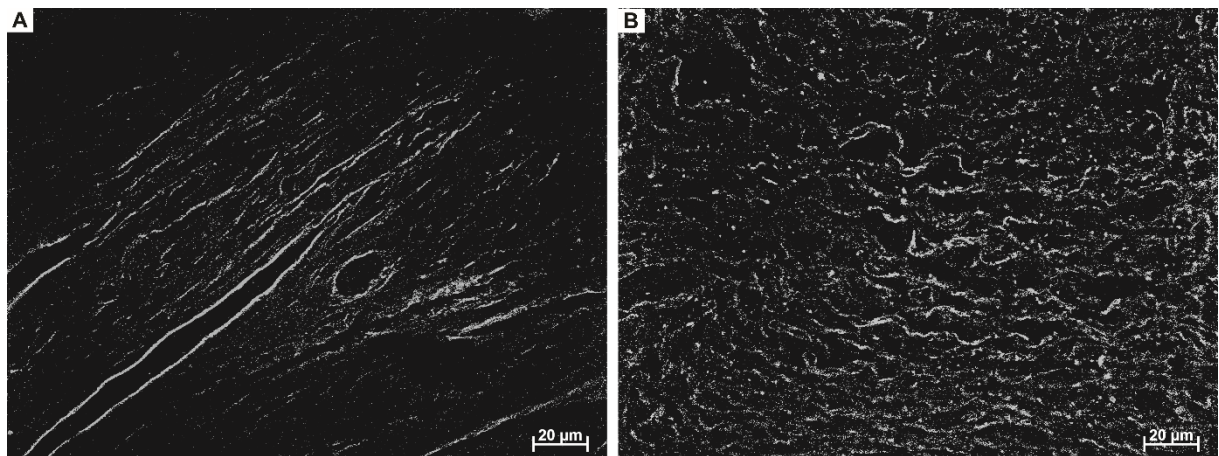


Figura 16 – GAG sulfatado isolado em imagens de 8 bit. Imagens de microscopia óptica do grupo controle (A) e descelularizado (B). Barra de escala: 20 µm

Em um primeiro momento após a descelularização, observou-se que o conteúdo de GAG sulfatada presente no tecido acelular ($n=5$) era ligeiramente superior ao presente no tecido nativo ($n=5$) ($6,99 \pm 0,27 \mu\text{m}$ contra $5,35 \pm 0,19 \mu\text{m}$; $p=0,0012$) (FIG. 17).

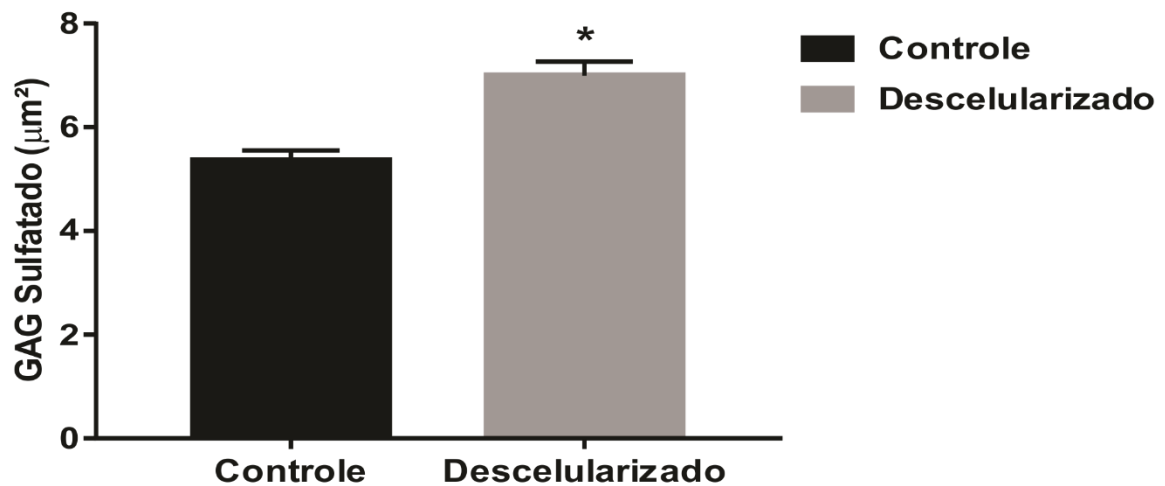


Figura 17 – GAG sulfatada por μm^2 em grupos controle ($n=5$) e descelularizado ($n=5$). Os dados estão expressos como média \pm EPM; (* $p=0,0012$, teste t de Student).

O resultado foi normalizado com a aplicação do índice de retração tecidual no grupo descelularizado. Após a normalização observou-se a manutenção de GAG sulfatada quando comparado ao grupo nativo ($5,12 \pm 0,19 \mu\text{m}$ contra $5,35 \pm 0,19$) ($p=0,42$) (Fig. 18).

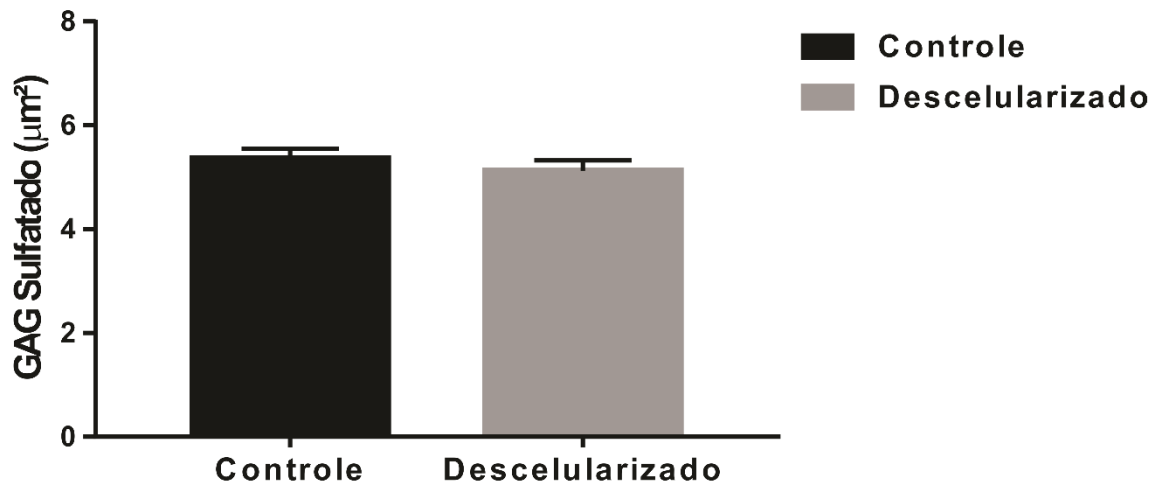


Figura 18 – GAG sulfatado normalizado por μm^2 em grupos controle ($n=5$) e descelularizado ($n=5$). Os dados estão expressos como média \pm EPM; ($p=0,4214$, teste t de Student).

5.10. ANÁLISE QUANTITATIVA DE GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS

Os animais utilizados em ambos os grupos não apresentaram diferença significativa ($p=0,61$). O mesmo aconteceu em comparação entre órgãos ($p=0,52$). O grupo descelularizado apresentou peso maior no momento pós-descelularização quando comparado ao momento pré descelularização ($p=0,03$) (TABELA 3).

Tabela 4 – Dados referentes a peso de animais, órgãos nativos e descelularizados, e quantidade sulfato de condroitina encontrado em cada grupo.

	Controle	Descelularizado
Peso animal (g)	$2,86 \pm 0,14$	$2,75 \pm 0,09$
Peso de órgão nativo (mg)	$14,68 \pm 0,27$	$14,44 \pm 0,23$
Peso de órgão descelularizado (mg)	-	$15,37 \pm 0,27$
Quantidade de GAG sulfatado ($\mu\text{g}/\text{órgão}$)	$34,13 \pm 1,76$	$6,58 \pm 1,06^*$

* $p=0,0001$, teste *t* de Student

A partir de uma curva padrão confeccionada com concentrações de sulfato de condroitina entre 3,1 e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($R=0,9967$) (FIG. 19), foram mensurados o teor desta GAG em grupos controle e descelularizado.

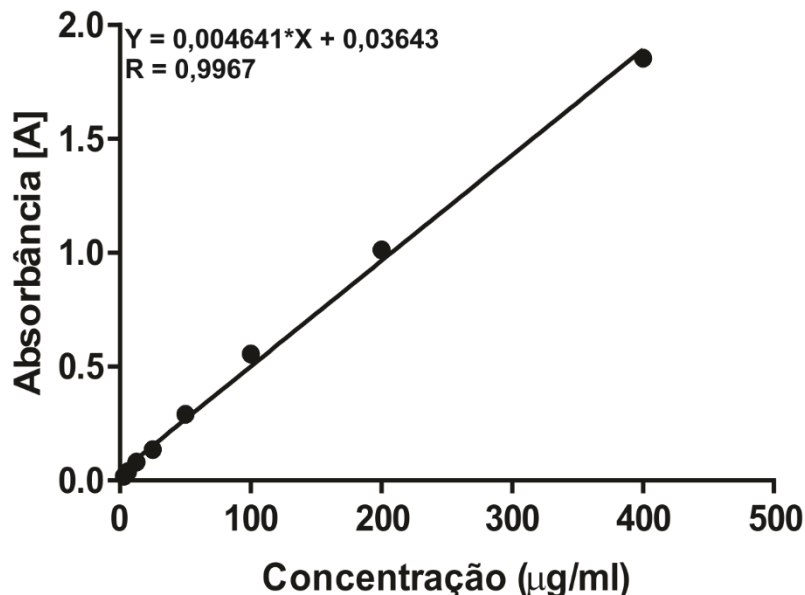


Figura 19 – Curva padrão de Sulfato de condroitina confeccionada com concentrações entre 3,1 e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. R square = 0,9967.

O grupo controle ($n=5$) apresentou valor médio de $34,13 \pm 1,76$ μg de GAG sulfatado/órgão, valor superior ao encontrado no grupo descelularizado ($n=5$), cuja

média foi $6,58 \pm 1,06 \mu\text{g}/\text{órgão}$. Ao compararmos o teor de sulfato de condroitina em ambos os grupos, observamos que houve diferença significativa ($p=0,0001$) (FIG 20).

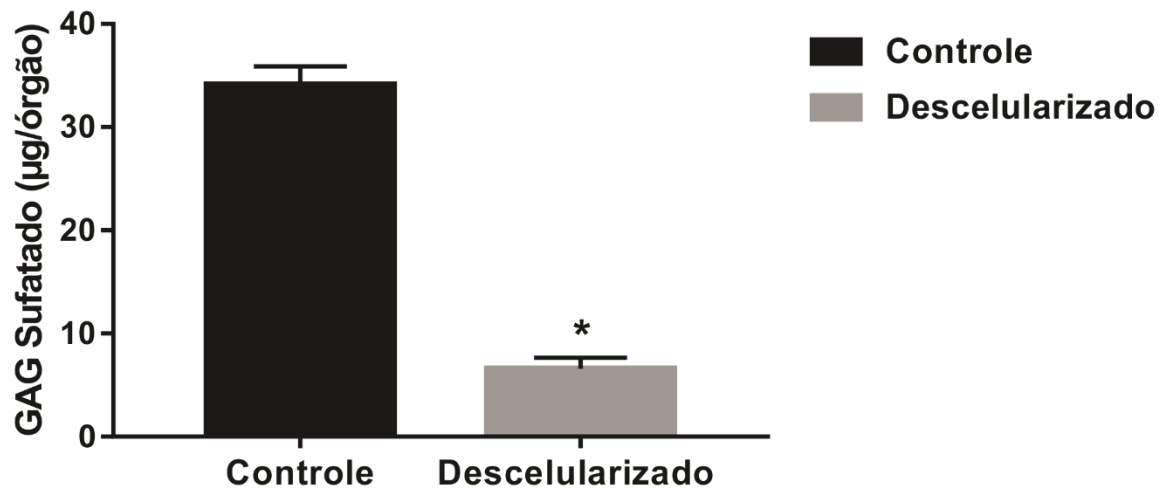


Figura 20 – Concentração de sulfato de condroitina por tecido inteiro em grupos controle ($n=5$) e descelularizado ($n=5$). Os dados estão expressos como média \pm EPM; (* $p=0,0001$, teste t de Student).

5.11. ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DE GLICOSAMINOGLICANO NÃO SULFATADO

A coloração histoquímica pelo método de Alcian blue pH 2,5 foi capaz de evidenciar em cor azul todo o conteúdo de glicosaminoglicano não sulfatado e em amarelo esverdeado as células e o restante da ECM (FIG. 21A). No tecido descelularizado (FIG. 21B) os glicosaminoglicanos são evidentes em diversos níveis de observação.

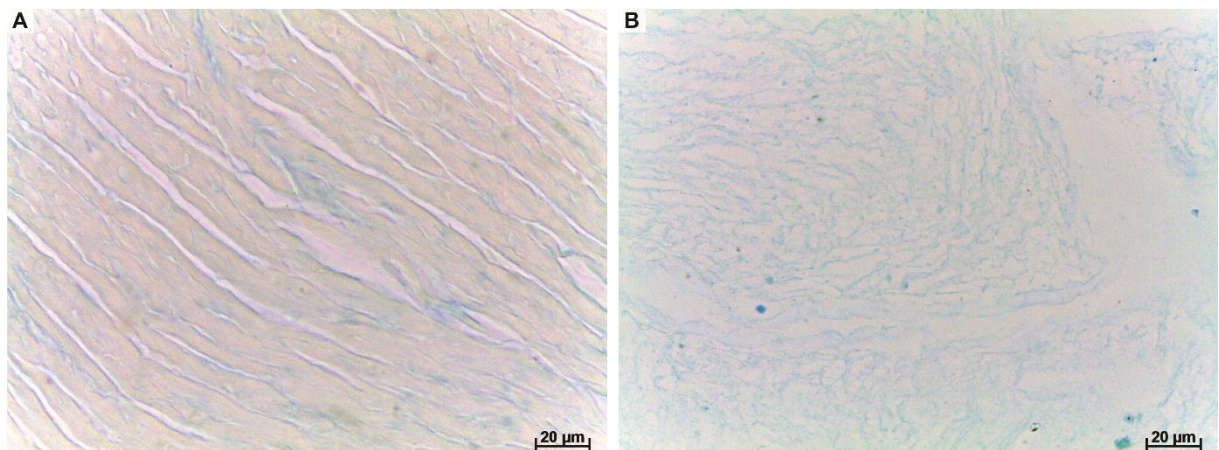


Figura 21 – Coloração com Alcian Blue pH 2,5. Imagens de microscopia óptica dos grupos controle (A) e descelularizado (B). Barra de escala: 20 μ m

Este método histoquímico permitiu que a partir de imagens de GAG não sulfatado isolado em 8 bit (FIG. 22A, e FIG. 22B) fosse realizada a mensuração do mesmo por fração de área.

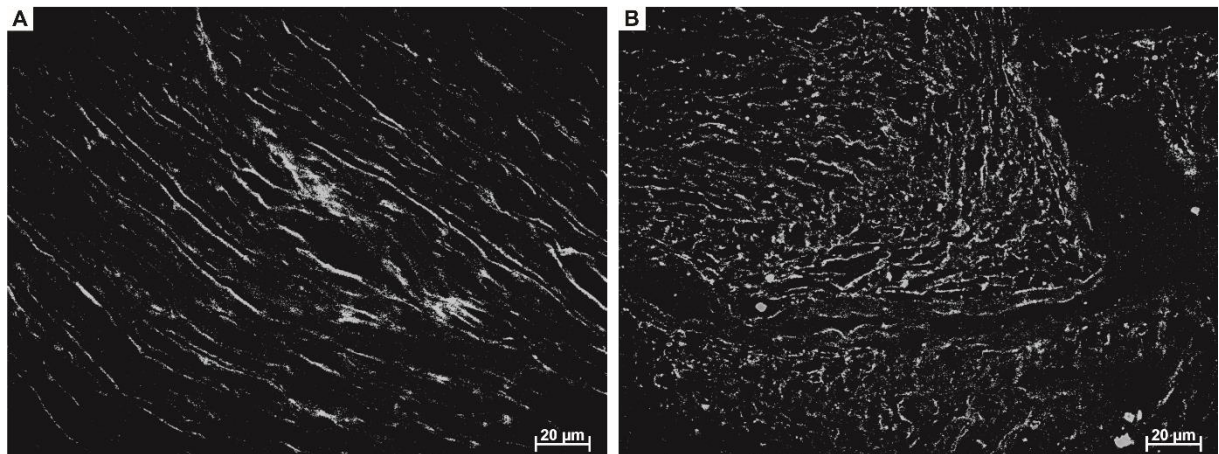


Figura 22 – GAG não sulfatado isolado em imagens de 8 bits. Imagens de microscopia óptica do grupo controle (A) e descelularizado (B). Barra de escala: 20 μ m

Em um primeiro momento após a descelularização, observou-se que o conteúdo de GAG não sulfatada presente no tecido acelular ($n=5$) era ligeiramente inferior ao presente no tecido nativo ($n=5$) ($4,93 \pm 1,14 \mu$ m contra $5,88 \pm 0,28 \mu$ m; $p=0,39$) (FIG. 23).

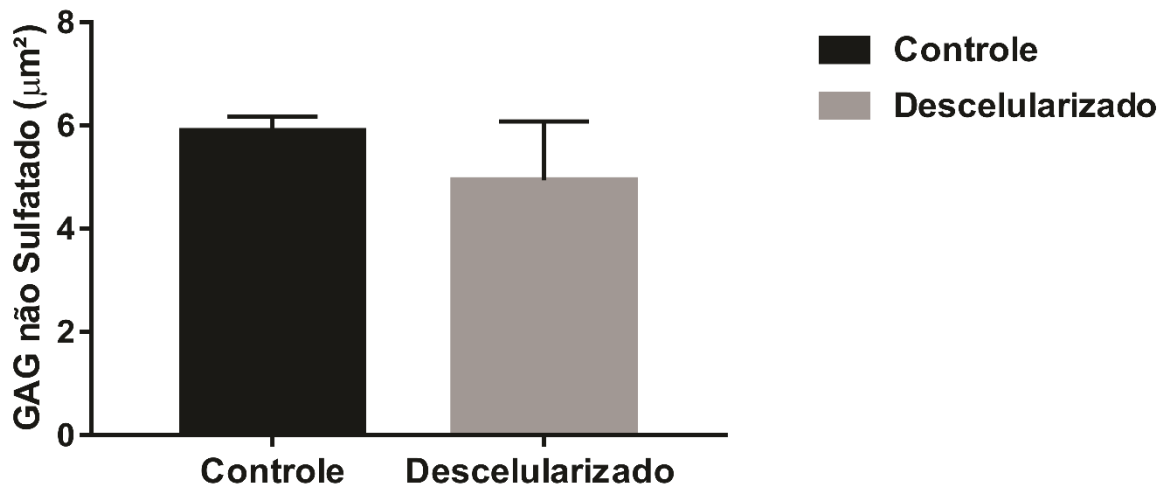


Figura 23 – GAG não sulfatada por μm^2 em grupos controle ($n=5$) e descelularizado ($n=5$). Os dados estão expressos como média \pm EPM; ($p=0,3958$, teste t de Student).

O resultado foi normalizado com a aplicação do índice de retração tecidual no grupo descelularizado. Após a normalização observou-se a redução significativa de GAG não sulfatado quando comparado ao grupo nativo ($3,62 \pm 0,83$ contra $5,8 \pm 0,28 \mu\text{m}$; $*p=0,02$) (Fig. 24).

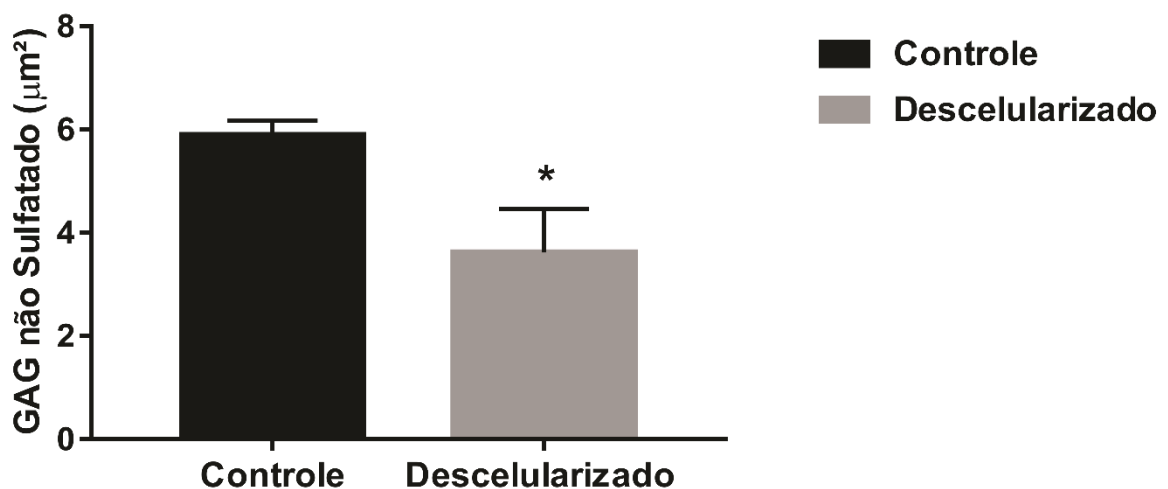


Figura 24 – GAG não sulfatado normalizado por μm^2 em grupos controle ($n=5$) e descelularizado ($n=5$). Os dados estão expressos como média \pm EPM; ($*p=0,0252$, teste t de Student).

5.12. ANÁLISE QUALITATIVA DE GLICOPROTEÍNAS

O método histoquímico de PAS foi capaz de evidenciar todo o conteúdo de carboidratos extracelulares e intracelulares (FIG. 25A). No tecido descelularizado (FIG. 25B) evidencia-se o conteúdo remanescente de glicoproteínas da ECM em diversos níveis de observação.

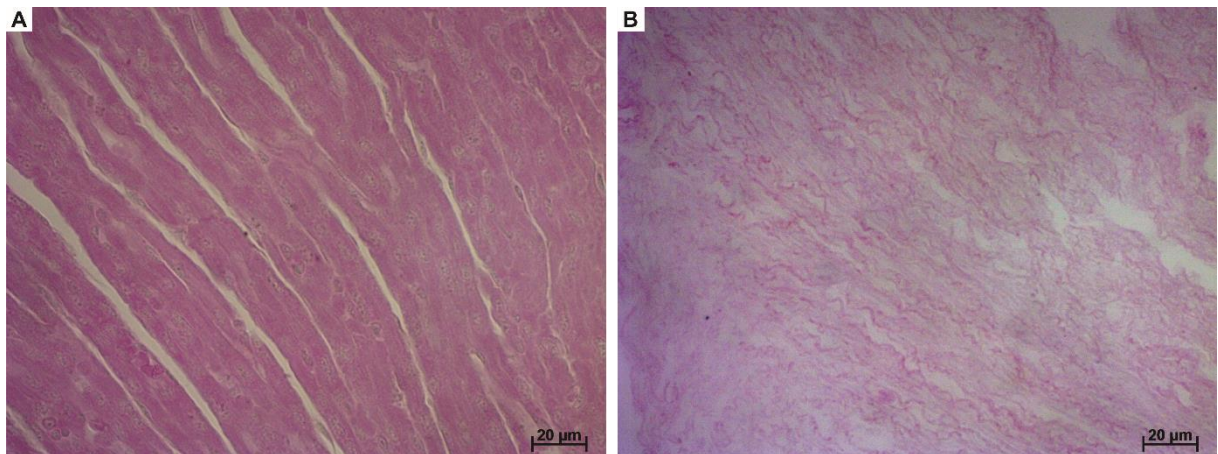


Figura 25 – Coloração com PAS. Imagens de microscopia óptica dos grupos controle (A) e descelularizado (B). Barra de escala: 20 µm

5.13. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE FIBRONECTINA

A marcação imunohistoquímica com anticorpo anti-fibronectina evidenciou a presença de fibronectina em tecido nativo (FIG. 26A) e demonstrou a manutenção da mesma em tecido descelularizado (FIG. 26B).

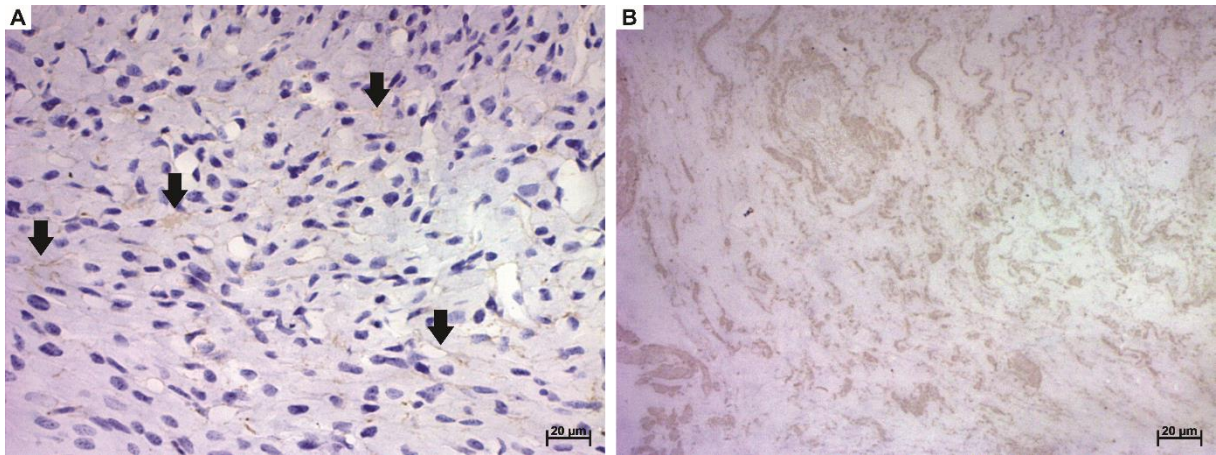


Figura 26 – Marcação imunohistoquímica com anticorpo anti-fibronectina. Imagens de microscopia óptica dos grupos controle (A) e descelularizado (B). Barra de escala 20μm.

5.14. DETERMINAÇÃO DE SDS RESIDUAL

A partir da curva padrão confeccionada com concentrações de SDS entre 0,0039% e 0,25% ($R=0,998$) (FIG. 27), foram mensurados o teor remanescente de detergente em amostras descelularizadas submetidas (lavado) e não submetidas (controle positivo) a etapas de lavagem em água destilada.

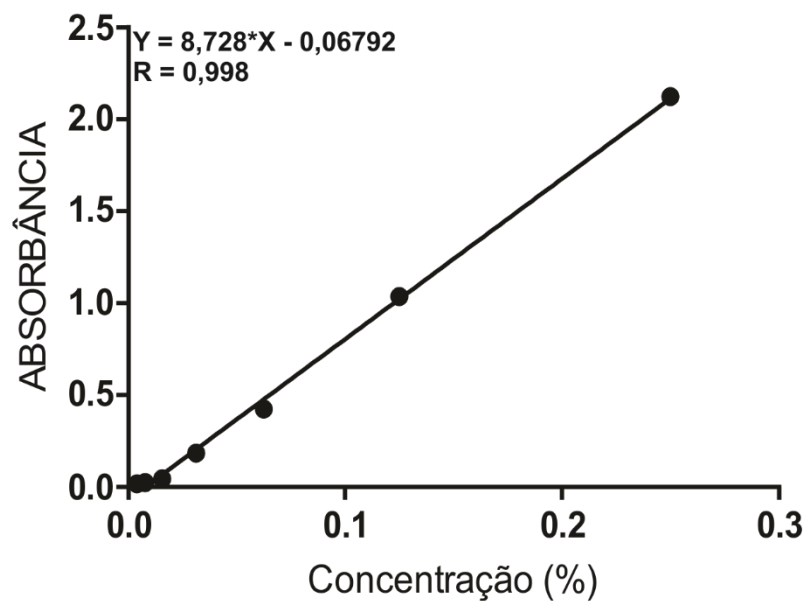


Figura 2257 – Curva padrão de SDS confeccionada com concentrações entre 0,0039% e 0,25%. R square = 0,998.

Em amostras maceradas de tecido descelularizado que foram submetidas a etapas de lavagem em água destilada ($n=8$) como padronizado no protocolo de descelularização, foi encontrada concentração média de $0,01129 \pm 0,0002505\%$ ($1,95 \pm 0,06$ mg) de detergente residual. Em grupo contendo amostras de tecido que não passaram por etapas de lavagem ($n=5$), encontramos concentração média de $0,01826 \pm 0,0006927\%$ ($1,26 \pm 0,02$ mg) de SDS residual. Observamos diferença significativa ($*p=0,0001$) quando comparados os grupos (FIG. 28).

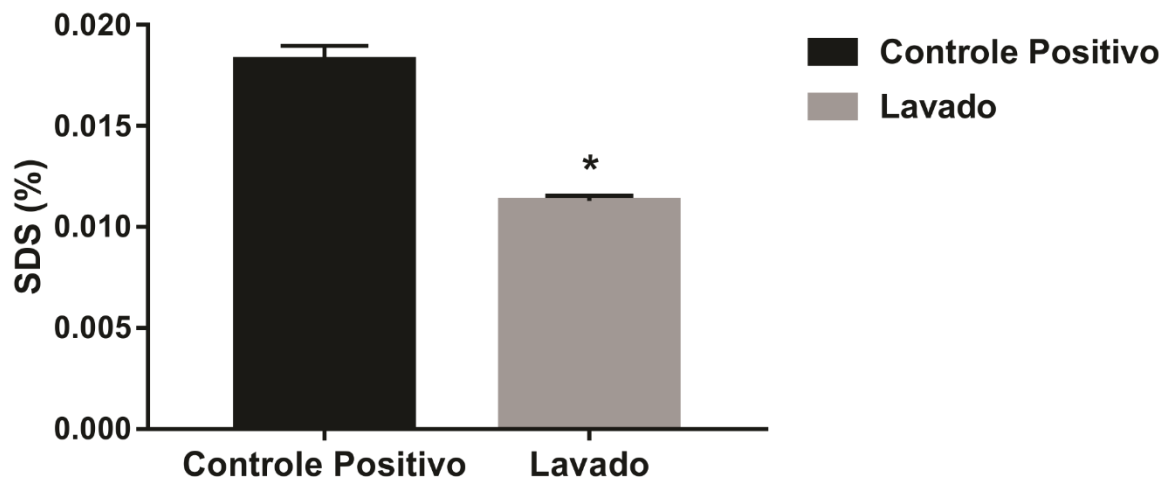


Figura 268 – Detergente residual em controle positivo ($n=5$) e amostras lavadas ($n=8$). Os dados estão expressos como média \pm EPM; ($****p=0,0001$, teste t de Student).

5.15. ISOLAMENTO CELULAR E RECELULARIZAÇÃO

Utilizando camundongos neonatos com três dias de vida ($n=5$) obtivemos em média $2,16 \times 10^5$ células em cada coração nativo. As células foram semeadas em andaimes acelulares ($n=5$). Em análise histológica realizada em ECM repovoada observamos a presença em evidência de população celular (FIG. 29A). É evidente ainda a presença de citoplasma e núcleos celulares distinguíveis (FIG. 29B).

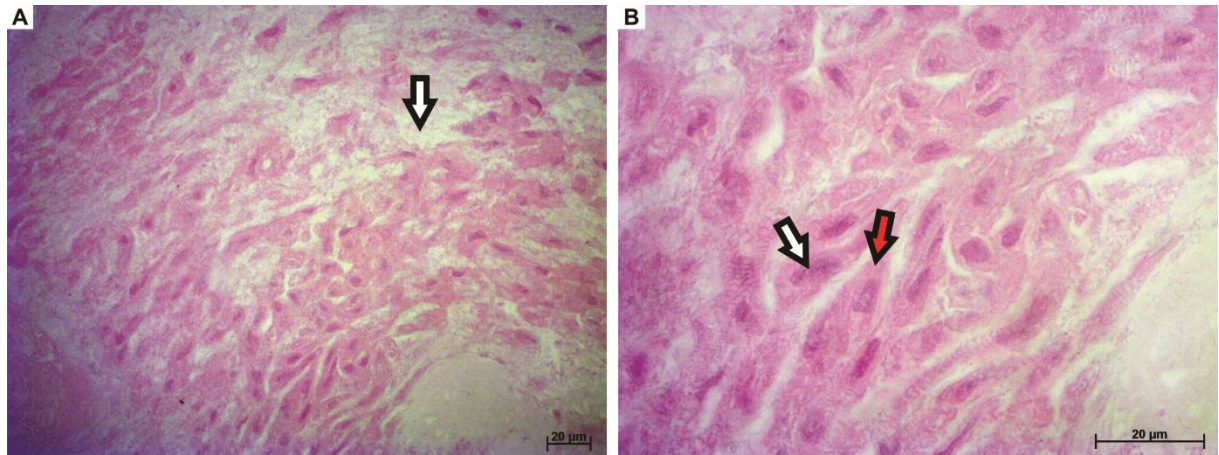


Figura 29 – Histologia da ECM repovoada. Coloração por Hematoxilina e Eosina. Em A), fotografia realizada em objetiva de 40x, podemos observar aparente população celular e além disso, arcabouços da ECM sinalizado pela seta branca. Em B), fotografia realizada em objetiva de 100x, evidencia-se o citoplasma celular na seta vermelha, além de núcleo celular apontado pela seta branca. Barra de escala 20µm.

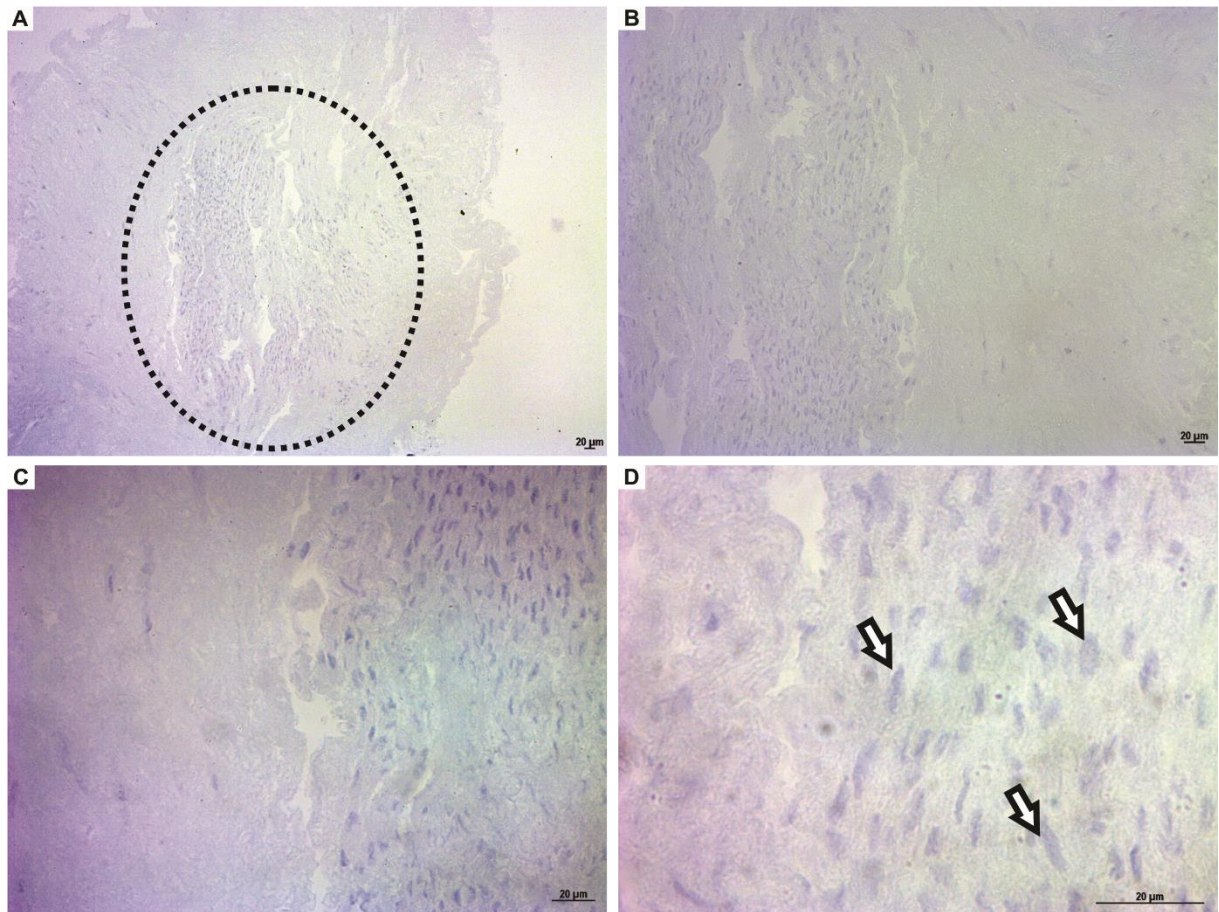


Figura 30 – Histologia da ECM repovoada. Coloração por Hematoxilina. Fotografias realizadas em objetivas de 10, 20, 40 e 100x. Podemos observar aparente população celular e além disso, arcabouços da ECM sinalizado pela seta branca.

Observamos que no sétimo dia de cultura da ECM repovoada, era evidente a presença de células aderidas na placa e cultura (FIG. 30) na região exterior ao andaime recelularizado.

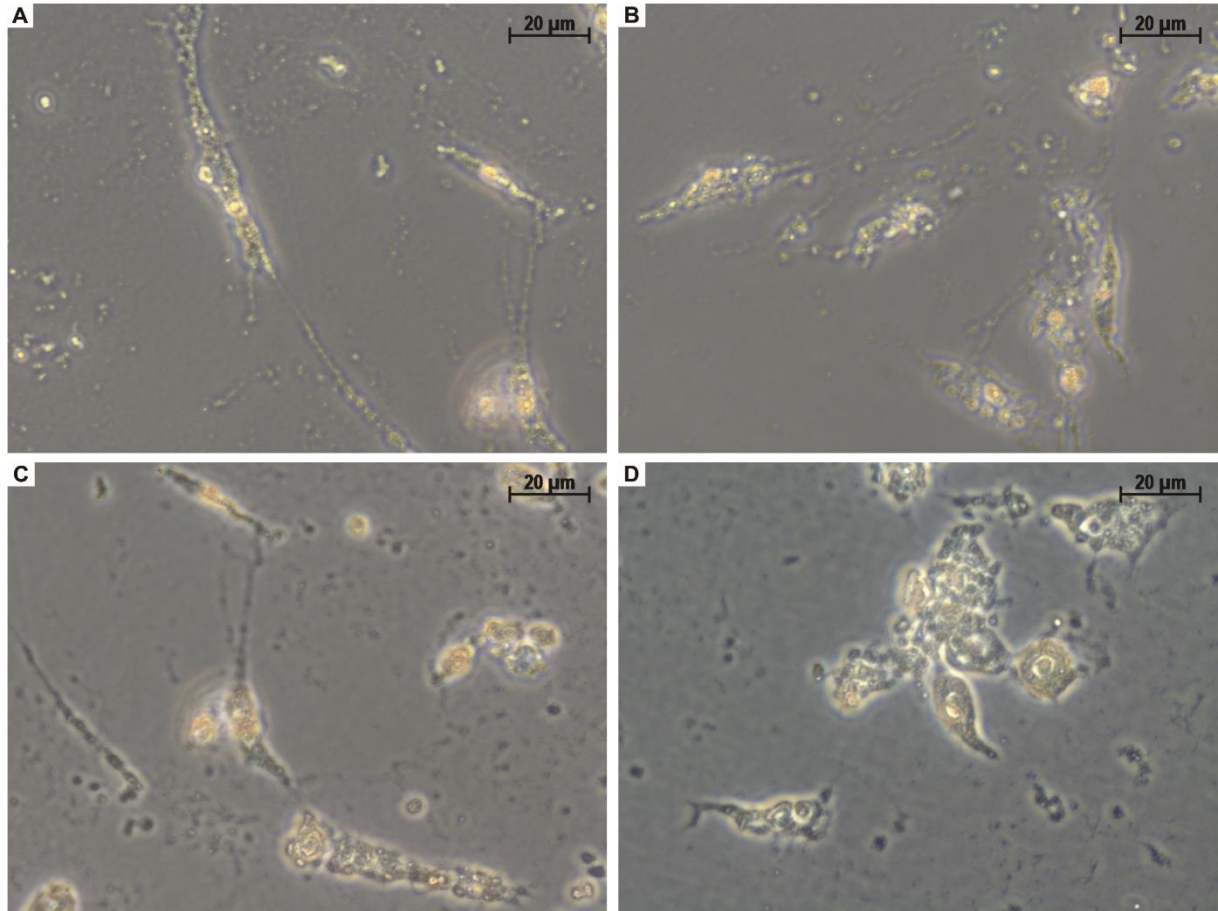


Figura 31 – Células encontradas aderidas na placa contendo ECM repovoada. Barra de escala: 20µm.

5.16. TESTE DE IMUNOREATIVIDADE

Em todos os grupos experimentais avaliamos visualmente o local da cirurgia do momento pré-operatório até ao último dia pré-definido. No grupo da cirurgia de Sham (FIG. 32), Implante (FIG. 33) e Implante nativo (FIG. 34) observamos que ao sétimo dia era discernível a presença de rubor local (FIG 32B; 33B e 34B). Ao fim do vigésimo oitavo dia de análise, o grupo de Sham e Implante não apresentavam sinais macroscópicos de inflamação (FIG. 32C e 33C), na contramão do Implante nativo, cuja presença de intenso rubor ainda era notado (FIG. 34C).



Figura 32 – Procedimento de SHAM realizado em orelha de camundongos. Em A), o momento pré cirúrgico. Em B), 7 dias após o implante observamos vermelhidão local. Em C), no 28º dia após a cirurgia, podemos observar a ausência de sinal inflamatório.

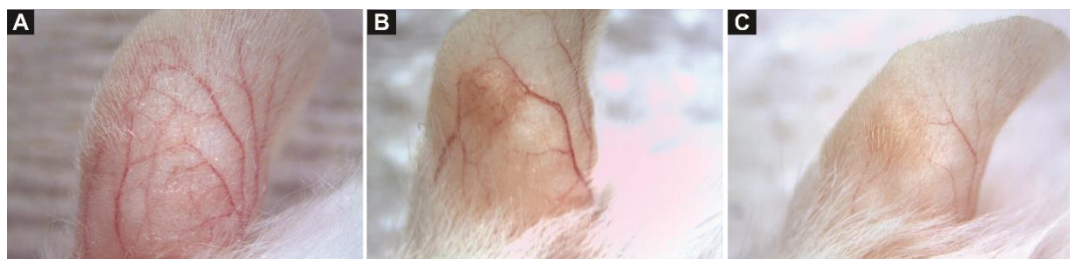


Figura 33 – Implante de ECM realizado em orelha de camundongos. Em A), o momento pré cirúrgico. Em B), 7 dias após o implante observamos vermelhidão local. Em C), no 28º dia após a cirurgia, podemos observar a ECM presente e sem sinal de vermelhidão

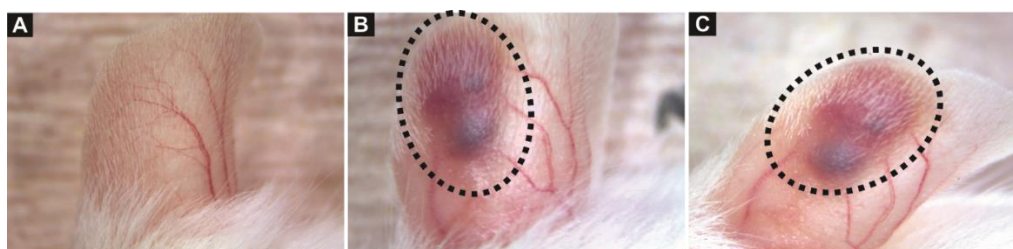


Figura 34 - Implante de ECM nativa realizado em orelha de camundongos. Em A), o momento pré cirúrgico. Em B), 7 dias após o implante observamos rubor local. (Em C), no 28º dia após a cirurgia, podemos observar a ECM a manutenção do rubor local.

A contagem de leucócitos totais foi realizada no grupo falso operado (n=6), implante (n=6) e implante nativo (n=6) (TABELA 4 e FIG. 35). Em momento pré cirúrgico o grupo falso operado, implante e implante nativo apresentaram-se com valor médio de leucócitos de $4.458 \pm 543/\text{mm}^3$, $5.333 \pm 856/\text{mm}^3$ e $6.262 \pm 309/\text{mm}^3$ respectivamente. Na segunda leitura, uma semana após o procedimento cirúrgico, como esperado, o número de leucócitos totais elevou-se atingindo médias de $9.358 \pm 909/\text{mm}^3$, $7.652 \pm 1180/\text{mm}^3$ e $12.105 \pm 1853/\text{mm}^3$ nos grupos falso operado, implantado e implantado nativo respectivamente. A partir da segunda semana de cirurgia, a contagem de leucócitos totais no grupo Sham e implante apresentou tendência de queda, com valores médios de $7.400 \pm 659/\text{mm}^3$ e $5.104 \pm 799/\text{mm}^3$. No entanto, no terceiro grupo o número de leucócitos continuou estável $12.333 \pm 2069/\text{mm}^3$. Na terceira semana, os níveis de leucócitos nos grupos Sham e implante apresentaram-se estáveis com valores médios de $7757 \pm 326/\text{mm}^3$ e $6721 \pm 404/\text{mm}^3$. O grupo implante nativo passou a apresentar tendência de queda com valor médio de $9.858 \pm 1.379/\text{mm}^3$. Na quarta e última semana de cirurgia os níveis de leucócitos mantiveram-se estáveis nos grupos Sham e implante, com valores médios de $5437 \pm 399/\text{mm}^3$ e $6466 \pm 974/\text{mm}^3$. O grupo implante nativo, manteve valor médio de $9.843 \pm 936/\text{mm}^3$. Observamos que entre os tempos e grupos houve diferença significativa.

Tabela 5 Contagem total de leucócitos. Entre os tempos houve diferença significativa.

	Pré Operatório	7º Dia	14º Dia	21º Dia	28º Dia
Sham	4.458 ± 543	9.358 ± 909*	7.400 ± 659 ^α	7.757 ± 326	5.437 ± 399 ^η
Implante	5.333 ± 856	7.652 ± 1180	5.104 ± 799 ^λ	6.721 ± 404 ^δ	6.466 ± 974 ^μ
Implante Nativo	6.262 ± 309	12.105 ± 1853	12.333 ± 2069	9.858 ± 1.379	9.843 ± 936

(*) Implante vs. Implante nativo. (α) Falso operado vs. Implante nativo. (λ) Implante vs. Implante nativo. (δ) Implante vs. Implante nativo. (η) Falso operado vs. Implante nativo. (μ) Implante vs. Implante nativo. $p=0,0010$. ANOVA – Duas vias

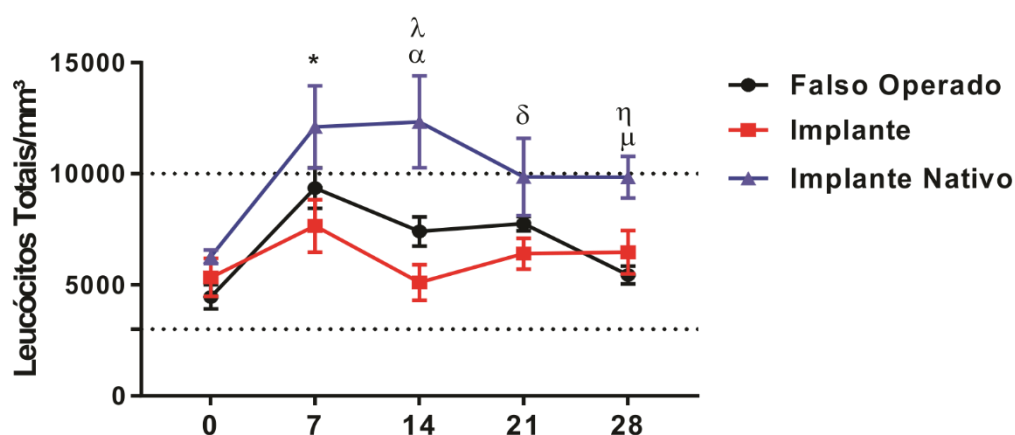


Figura 35 – Contagem de leucócitos totais. (*) Implante vs. Implante nativo. (α) Falso operado vs. Implante nativo. (λ) Implante vs. Implante nativo. (δ) Implante vs. Implante nativo. (η) Falso operado vs. Implante nativo. (μ) Implante vs. Implante nativo. Observamos que entre os grupos houve diferença significativa ($p=0,0052$, ANOVA – duas vias).

A contagem diferencial de neutrófilos evidencia aparente atividade inflamatória em resposta ao trauma cirúrgico nos grupos Sham, Implante e Implante Nativo (TABELA 5 e FIG. 36). Nos dois primeiros grupos a atividade de neutrófilos tende a normalizar a partir do décimo quarto dia de cirurgia, chegando a normalidade no vigésimo oitavo dia. Entretanto, na contramão, no último grupo a atividade de neutrófilos continua elevada até o vigésimo dia pós cirurgia, normalizando-se no vigésimo oitavo. Observamos que entre os tempos houve diferença significativa, no entanto, ao comparar ambos os grupos, não houve diferença.

Tabela 6 Contagem diferencial de neutrófilos.

	Pré Operatório	7º Dia	14º Dia	21º Dia	28º Dia
Sham	14,6 ± 1,3	21,8 ± 2,0*	13,0 ± 1,5 ^α	13,5 ± 0,8 ^{δ η}	11,0 ± 0,3
Implante	16,8 ± 2,0	30,0 ± 3,9	13,5 ± 2,1 ^λ	14,3 ± 1,5	13,8 ± 0,6
Implante Nativo	12,5 ± 1,1	27,1 ± 0,9	20,0 ± 0,3	22,0 ± 2,2	12,6 ± 1,3

(*) Falso operado vs. Implante. (α) Falso operado vs. Implante nativo. (λ) Implante vs. Implante nativo. (δ) Falso Operado vs. Implante. (η) Falso operado vs. Implante nativo. *p=0,0001 – ANOVA – duas vias.

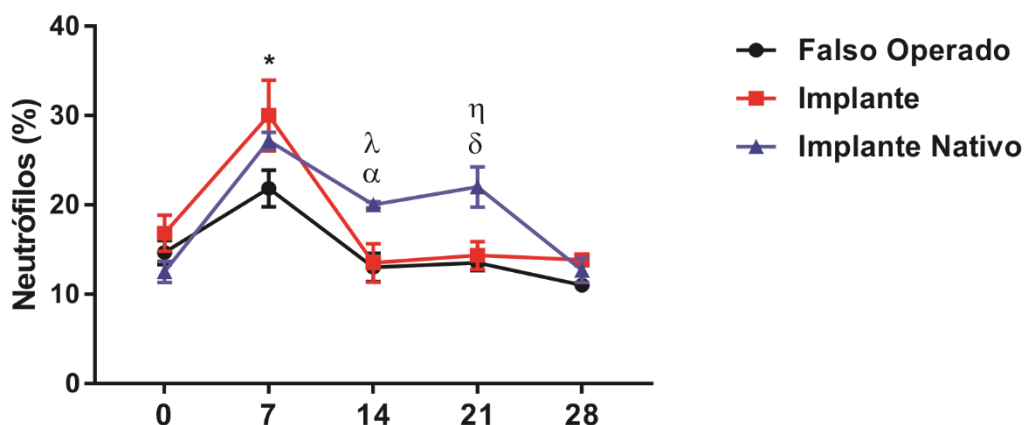


Figura 276 – Contagem de neutrófilos. (*) Falso operado vs. Implante. (α) Falso operado vs. Implante nativo. (λ) Implante vs. Implante nativo. (δ) Falso Operado vs. Implante. (η) Falso operado vs. Implante nativo. Observamos que entre os grupos houve diferença significativa (p= 0,0537, ANOVA – duas vias)

A contagem diferencial de linfócitos demonstra aparente redução desta classe celular em função da proporcionalidade de neutrófilos encontrados (TABELA 6 e FIG. 37). Nos dois primeiros grupos a atividade de linfócitos tende a normalizar a partir do décimo quarto dia de cirurgia, chegando a normalidade no vigésimo oitavo dia. Entretanto, na contramão, no último grupo a atividade de linfócitos continua reduzida até o vigésimo dia pós cirurgia, normalizando-se no vigésimo oitavo. Observamos que entre os tempos houve diferença significativa, no entanto, ao comparar ambos os grupos, não houve diferença.

Tabela 7 Contagem diferencial de linfócitos. Entre os tempos houve diferença significativa.

	Pré Operatório	7º Dia	14º Dia	21º Dia	28º Dia
Sham	83,8 ± 1,9	77,1 ± 3,3 ^{*α}	85,6 ± 0,7 ^λ	82,0 ± 0,9 ^δ	85,5 ± 1,0
Implante	81,8 ± 2,1	67,8 ± 4,0	83,8 ± 2,8	83,1 ± 1,9 ^η	82,0 ± 0,8
Implante Nativo	84,6 ± 1,1	70,3 ± 0,6	78,5 ± 0,6	75,0 ± 2,5	82,6 ± 2,1

(*) Falso operado vs. Implante. (α) Falso operado vs. Implante nativo. (λ) Falso operado vs. Implante nativo. (δ) Falso Operado vs. Implante nativo. (η) Implante vs. Implante nativo. *p=0,0001. ANOVA – Duas vias.

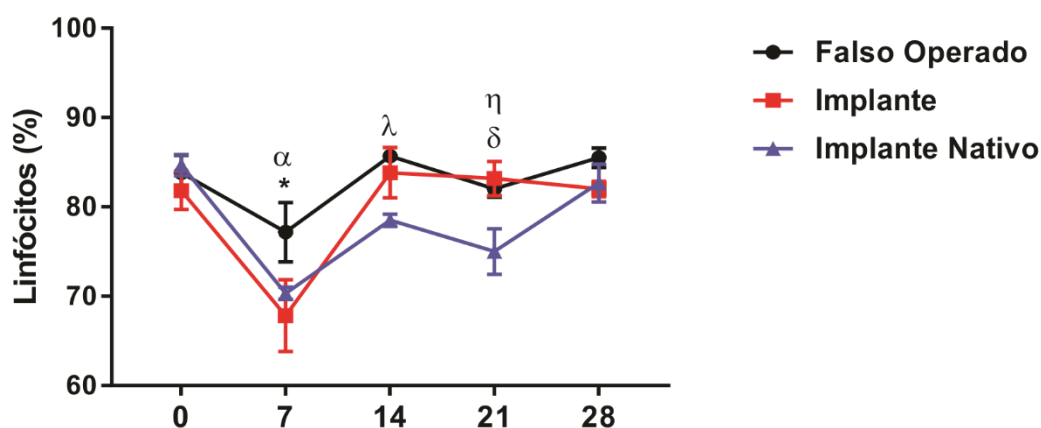


Figura 37 – Contagem de linfócitos.. (*) Falso operado vs. Implante. (α) Falso operado vs. Implante nativo. (λ) Falso operado vs. Implante nativo. (δ) Falso Operado vs. Implante nativo. (η) Implante vs. Implante nativo. Observamos que entre os grupos que houve não diferença significativa ($p=0,0651$, ANOVA – duas vias).

Ao fim das análises de leucócitos totais e diferenciais pré-definias, realizamos análise histológica de orelha controle, orelha do grupo Sham e orelha com implante de ECM. Observamos no grupo controle (FIG. 38A e B) as condições normais do tecido, sem sinal de alterações morfológicas. Em análise histológica utilizando colorações histoquímicas de HE, Picrosirius e Alcian Blue pH 0,5 realizada em um grupo controle negativo observamos que o tecido se encontrava em condições normais, sem sinal aparente de alterações morfológicas consideráveis (FIG. 38A e B, 39A e B, 40A e B), algo observado também em análise do grupo Sham, cujo aspecto visual não apresentava diferença quando comparado ao grupo controle (FIG. 38A e B, 39A e B, 40A e B). A histologia do grupo implantado possibilitou a observação da presença da ECM que demonstrou não possuir capsula, além de não possuir atividade inflamatória discernível, além disso, observou-se a presença de infiltrados celulares (FIG 38E e F, 39E e F, 40E e F). A coloração histoquímica por alcian blue pH 0,5 possibilitou a observação e avaliação de estruturas cartilaginosas. Observamos que o tecido descelularizado do grupo implantado apresentou pontos sugestivo de áreas de condrogênese (FIG. 39E, 40E e F). Em análise histológica do grupo implantado com tecido nativo, observamos intensa atividade inflamatória com infiltrado celular inflamatório característico (FIG 38G e H, 39G e H, 40G e H).

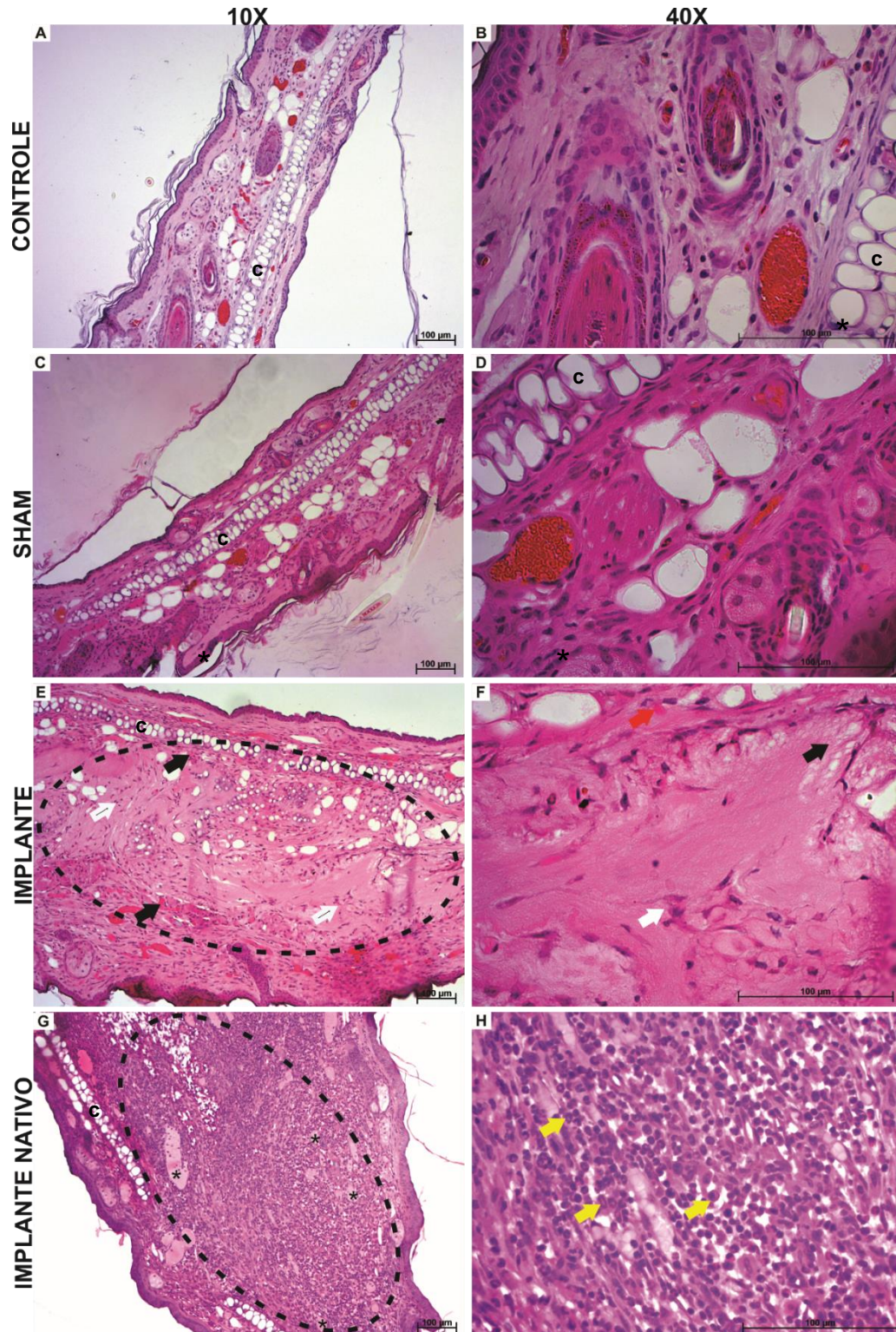


Figura 288 – Análise histológica do grupo Controle, Sham, Implante e Implante nativo. Coloração de Hematoxilina e Eosina. (*) Vasos e capilares. (c) Cartilagem. A-B) Observa-se o tecido controle sem alterações com evidência normal de capilares e cartilagem. C-D) Não observamos alterações visuais significativas quando comparado ao grupo controle. O tecido apresenta vascularidade e cartilagem normais. E-F) O pontilhado delimita parcialmente a ECM implantada. Seta preta em E) demonstra os capilares. Setas brancas em F) demonstram as células residentes, e a seta vermelha evidenciam vaso sanguíneo. A seta preta demonstra a ECM. G-H) O pontilhado delimita parcialmente o tecido nativo implantado. É evidente a presença de intensa vascularidade, além de grande aglomerado de células inflamatórias evidenciadas pelas setas amarelas. Barra de escala: 100 µm.

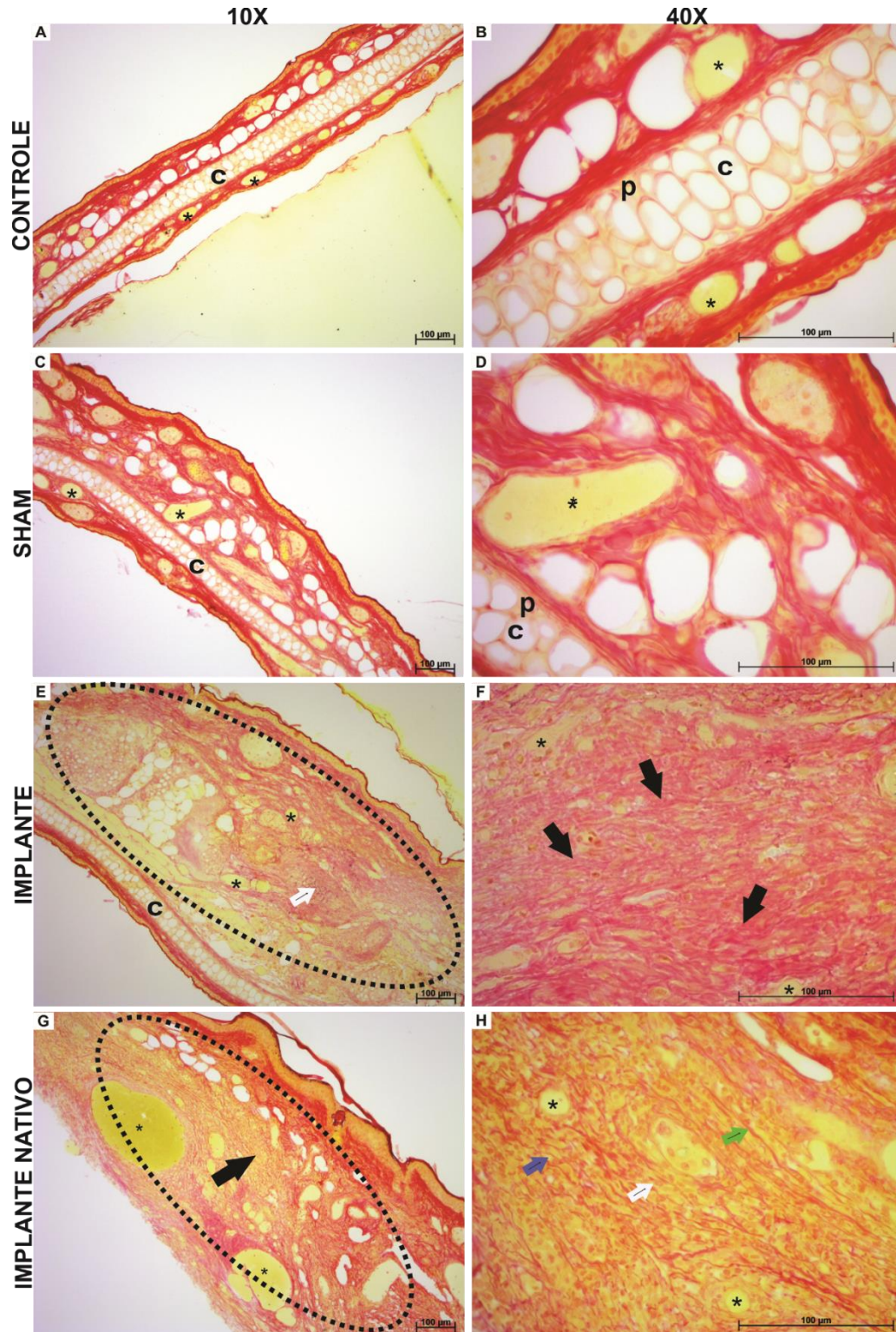


Figura 39 – Análise histológica do grupo Controle, Sham, Implante e Implante nativo. Coloração de picro-sírius. (*) Vasos e capilares. (c) Cartilagem. (p) Pericôndrio. A-B) Observa-se o tecido controle sem alterações com evidência normal de capilares e cartilagem. C-D) Não observamos alterações visuais significativas quando comparado ao grupo controle. O tecido apresenta vascularidade e cartilagem normais. E-F) O pontilhado delimita parcialmente a ECM implantada. Seta branca demonstra a ECM. Seta preta em F) demonstra colágeno em abundância. G-H) O pontilhado delimita parcialmente o tecido nativo implantado. A seta preta evidencia o tecido implantado. Seta cinza e branca demonstra células inflamatórias. Seta verde demonstra fibra colágena. Barra de escala: 100 μ m

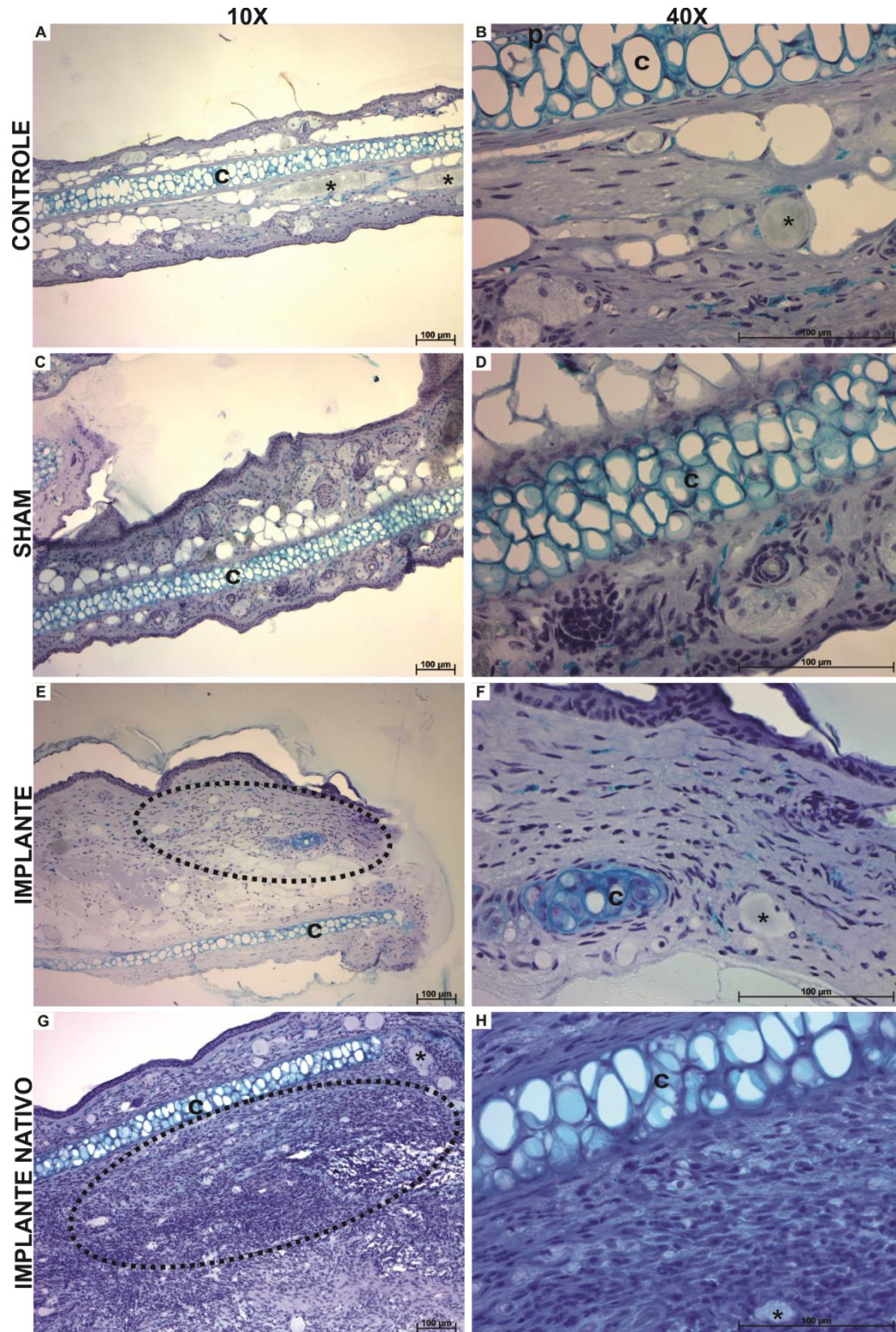


Figura 40 – Análise histológica do grupo Controle, Sham, Implante e Implante nativo. Coloração de Acian blue pH 2,5. (*) Vasos e capilares. (c) Cartilagem. (p) Pericôndrio. A-B) Observa-se o tecido controle sem alterações com evidência normal de capilares e cartilagem. C-D) Não observamos alterações visuais significativas quando comparado ao grupo controle. O tecido apresenta vascularidade e cartilagem normais. E-F) O pontilhado delimita parcialmente a ECM implantada. G-H) O pontilhado delimita parcialmente o tecido nativo implantado. A seta preta demonstra células inflamatórias. Barra de escala: 100 µm

6. DISCUSSÃO

Mais de 50% dos pacientes acometidos por doenças cardiovasculares não respondem satisfatoriamente as terapias farmacológicas disponíveis (LU et al., 2013). Uma abordagem terapêutica parcialmente satisfatória que poderia resolver a boa parte dos casos é o transplante de coração, que consiste na substituição do coração doente por um sadio. Um agravante para a utilização de tal abordagem está nas elevadas taxas de rejeição imunológica, e além disso, existe uma grande necessidade de órgãos para transplante (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS, 2015; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS, 2016). Estratégias promissoras para esses pacientes estão sendo estudadas e desenvolvidas, como por exemplo, a descelularização de órgãos para desenvolvimento de tecidos sadios capazes de substituir um tecido doente (LU et al., 2013; PARMAKSIZ et al., 2016; SPECTOR, 2016).

Utilizando uma combinação de abordagens químicas e físicas, biomateriais naturais compostos exclusivamente de ECM nativa são sintetizados e podem servir como andaime natural para fixação, proliferação, diferenciação e maturação celular (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; JALILI-FIROOZINEZHAD et al., 2016). Esta estratégia seria capaz de solucionar problemas referentes à rejeição imunológica (LONDONO; BADYLAK, 2015), visto que órgãos poderiam ser desenvolvidos utilizando populações celulares isoladas do próprio paciente.

No presente estudo, camundongos Swiss neonatais foram utilizados como modelo experimental. A escolha está ligada diretamente a capacidade regenerativa e proliferativa que possuem seus corações em estágios de desenvolvimento embrionário e brevemente pós-natal (JESTY et al., 2012; POLIZZOTTI et al., 2017; PORRELLO et al., 2011; PORRELLO; OLSON, 2014). Desenvolvemos um método de descelularização que consiste em submergir o coração em SDS à 0,2% por 48 horas sob baixa agitação. Diferindo de GARRY et. al. (2016), cujo coração foi descelularizado através de método por perfusão utilizando SDS à 1% e Triton X-100 a 1% por 14 horas (GARRY; KREN; GARRY, 2016). Apesar de nossa abordagem possuir tempo de descelularização superior, não aplicamos ao tecido qualquer valor

de pressão devido a sua sensibilidade, além disso, nós utilizamos em nossa abordagem, concentração consideravelmente inferior de detergente (0,2% contra 1%). É de conhecimento que expor tecidos a concentração elevada de SDS, foi demonstrado ser agressivo à ECM (ELDER; ELESWARAPU; ATHANASIOU, 2009).

O coração descelularizado apresentou aspecto translúcido ao final do processo, sugerindo fortemente a perda significativa de matéria celular. No entanto, apenas a translucidez não é critério para avaliação da descelularização. Para efeito de confiabilidade, parâmetros específicos devem ser adotados visando avaliar a microestrutura e a composição do tecido descelularizado. O primeiro deles é a confirmação de ausência de núcleos e detritos celulares por microscopia eletrônica de varredura e coloração histoquímica de hematoxilina e eosina (HE) (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Outro parâmetro importante é o teor de DNA remanescente. Além da utilização de microscopia e mensuração de DNA, a aplicação de método de fluorescência por 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) é capaz de demonstrar a ausência de material nuclear, visto que esta molécula fluorescente possui alta afinidade por material genético (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

A análise de microscopia eletrônica de varredura possibilitou que avaliássemos a presença de eventuais alterações na estruturais da ECM descelularizada. Observamos em tecido acelular inúmeras cavidades onde residiam as células. Certa alteração na microestrutura pode ser observada. Avaliamos que a ECM se apresentou retraída, o que se explica pelo fato de que a ausência de células torna a ECM frouxa, além disso, a retração pode estar relacionada também ao preparo da amostra, e necessariamente pode não significar uma alteração microestrutural. Assim como observado por SYEDAIN et al. (2013) cavidades onde antes estavam as células são encontradas no órgão descelularizado, além de certa alteração na microestrutura (SYEDAIN et al., 2013). Além de observar retração microestrutural, macroscopicamente notamos ligeira redução de área (mm²) no tecido descelularizado quando comparado ao nativo. Observamos que o descelularizado possuía área total 26,7% menor quando comparado ao controle nativo (14,25 mm² vs 19,47 mm²).

Outro parâmetro a ser considerado para confirmar uma descelularização é a determinação de material genético remanescente através de técnicas de biologia

molecular (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; SHIRAKIGAWA; HIROYUKI, 2017). Inicialmente, fora definido por CRAPO et. al. (2011) que a quantidade limite de DNA remanescente não deveria ascender 50 ng/mg de tecido seco, entretanto, o valor absoluto de material genético remanescente ainda não é consenso entre os pesquisadores (SHIRAKIGAWA; HIROYUKI, 2017). Nos últimos anos, estudos relacionados a descelularização cardíaca não seguiram parâmetro descrito por CRAPO et. al. (2011) e expressaram seus achados de diversas formas, como por quantidade de DNA em tecido inteiro, quantidade de DNA com base em peso úmido ou em peso seco, além de porcentagem (GARRY; KREN; GARRY, 2016; GUYETTE et al., 2014; LU et al., 2013; SILVA et al., 2016). Mensuramos a quantidade remanescente de material genético em ECM descelularizada, e com base no tecido total observamos redução significativa no conteúdo de DNA de em média 61,19 µg nos órgãos controles para 0,9155 µg no tecido descelularizado, significando uma redução de aproximadamente 98,5% (FIG. 6), valor consideravelmente superior ao encontrado por GARRY et. al. (2016), cujo modelo experimental e idade de animais foi o mesmo que o utilizado em nossa pesquisa. No estudo de GARRY et. al. (2016) o teor remanescente de material genético em ECM foi de em média 4,73 µg contra 68,08 µg em órgãos controles, significando redução de 93% de DNA (GARRY; KREN; GARRY, 2016). Como análise auxiliar a dosagem de DNA remanescente, observamos ausência de núcleos celulares ao realizamos coloração histoquímica por HE em coração descelularizado (FIG. 7B).

Um aspecto importante e essencial para o bom funcionamento de uma ECM descelularizada é a manutenção de sua integridade física e funcional. É de conhecimento que a descelularização utilizando SDS é um processo agressivo que não remove somente o conteúdo celular como também é capaz de afetar a estrutura e a bioatividade da ECM (FRIEDRICH et al., 2017). Quanto maior a concentração de detergente maior será a probabilidade de serem removidos junto às células, moléculas da ECM como colágeno, glicoproteínas e principalmente glicosaminoglicanas. LIAO et. al. (2008) utilizando 0,1% de SDS demonstrou preservar a composição e arquitetura da ECM de folhetos de válvula aórtica de suínos melhor que métodos a base de agentes como tripsina ou Triton x-100 (LIAO; JOYCE; SACKS, 2008). De contramão, ELDER et. al. (2009), demonstrou a remoção de todo o conteúdo de

glicosaminoglicanos ao utilizar 2% de SDS para descelularizar cartilagem articular (ELDER; ELESWARAPU; ATHANASIOU, 2009).

Normalmente, o ambiente extracelular cardíaco é composto principalmente por fibras de colágeno, glicoproteínas, glicosaminoglicanos e proteoglicanos (LOCKHART et al., 2011b; WILLIAMS et al., 2014). A presença dessas moléculas pode ser avaliada através de ensaios qualitativos, quantitativos e semi-quantitativos. No presente estudo, realizamos análises para determinação dos principais componentes descritos na literatura da ECM neonatal.

Determinamos através de análise semi-quantitativa o teor de colágeno tipo I a partir de imagens histológicas obtidas de coloração histoquímica de picro-sirius. Observamos que em análises de colágeno por fração de área a partir imagens 8 bits, o valor médio encontrado em tecido descelularizado ($7,71 \mu\text{m}^2$) foi consideravelmente superior ao valor encontrado no controle nativo ($5,76 \mu\text{m}^2$). Aplicamos o índice nas amostras descelularizadas subtraindo o valor da retração do valor total mensurado e observamos que os valores de colágeno em tecido descelularizado ($5,65 \mu\text{m}^2$) apresentaram-se normalizados.

Ainda não é consenso o teor ideal de moléculas proteicas e estruturais remanescentes na ECM. Entretanto, ainda que ocorra redução significativa, não será uma situação crítica se forem obtidos bons resultados no processo final de reconstrução do tecidual. Realizamos análises espectrofotométricas para aferir quantitativamente a quantidade de hidroxiprolina, importante aminoácido presente em todas as moléculas de colágeno. O colágeno é o componente mais abundante da ECM. Ele é uma proteína estrutural e funcional essencial e está presente em todos os tecidos e órgãos (GILLIES et al., 2011). O aminoácido hidroxiprolina está presente em pouquíssimas proteínas, a saber, no colágeno, representando aproximadamente 14% do mesmo, na elastina (1,6%), em menor extensão na proteína do complemento C1q, e em algumas proteínas vegetais. Por essa característica particular, a quantificação de colágeno em uma amostra de tecido pode ser feita indiretamente a partir da quantificação de hidroxiprolina na mesma (TORRE; LICHTIG; BERAQUET, 2004). Observamos a presença de hidroxiprolina tanto no tecido descelularizado ($317,80 \mu\text{g}/\text{coração}$) quanto no tecido nativo ($295,60 \mu\text{g}/\text{coração}$), corroborando análises semi-quantitativas

realizadas através da histoquímica por picrosirius. Os estudos voltados a detectar o teor de hidroxiprolina em ECM cardíaca descelularizada proveniente de camundongos neonatos são escassos, entretanto, já fora relatado a dosagem de colágeno pela determinação espectrofotométrica de hidroxiprolina em tecidos como fígado, pulmão de ratos e suínos respectivamente, além de coração de humanos (HILL et al., 2015; MAZZA et al., 2015; METHE et al., 2014).

Qualitativamente, a microscopia eletrônica de transmissão permitiu que houvesse avaliação íntima do ambiente micro estrutural da ECM descelularizada. Observamos intensa presença de grupamentos de fibras colágenas, e em menor quantidade moléculas de glicosaminoglicanos e glicoproteínas, além da ausência de unidades contrateis e restos celulares. Em coração nativo observamos a presença de sarcômeros, mitocôndrias e núcleos.

Os glicosaminoglicanos são heteropolissacarídeos presentes na MEC. São classificados de acordo com o tipo de açúcar presente em sua estrutura. A presença do açúcar sulfatado origina moléculas como sulfato de condroitina, sulfato de dermatan, sulfato de heparan além de sulfato de queratan. Quando não há a presença de um açúcar sulfatado, origina-se moléculas denominadas ácido hialurônico (LOCKHART et al., 2011a). As moléculas sulfatadas são encontradas na maioria das vezes ligadas covalentemente a um núcleo proteico para formar moléculas maiores denominadas de proteoglicanos, o que não ocorre com moléculas não sulfatadas. As moléculas de glicosaminoglicanos sulfatados ou não, possuem ativo papel no desenvolvimento e homeostase de tecidos. São responsáveis por funções de regulação de processos celulares complexos, além de interagirem com outras moléculas da MEC. A partir de técnica histoquímica de Alcian blue pH 0,5 avaliamos qualitativamente e semi-quantitativamente a presença de glicosaminoglicano sulfatado. A partir de imagens 8 bit, mensuramos teor de glicosaminoglicano sulfatado por fração de área e observamos em um primeiro momento que a presença de GAG sulfatado era ligeiramente em tecido descelularizado (6,99 vs. 5,35 μm^2), entretanto, após a aplicação do índice de retração tecidual, observamos sugestível normalização (5,12 μm^2). Dosamos através de análise espectrofotométrica o teor de glicosaminoglicanos sulfatados totais em tecido controle e descelularizado. A análise mostrou redução significativa quando comparamos tecido descelularizado (6,58

$\mu\text{g}/\text{coração}$) com o nativo ($34,13 \mu\text{g}/\text{coração}$). A acentuada queda deste tipo de GAG sulfatada pode ser explicada pela utilização de SDS para descelularização, visto que o mesmo como já é de conhecimento, acaba por remover este tipo de molécula (ELDER; ELESWARAPU; ATHANASIOU, 2009; FRIEDRICH et al., 2017). Os estudos voltados a detectar o teor de sulfato de condroitina em ECM cardíaca descelularizada proveniente de camundongos neonatos são extremamente escassos. A dosagem deste tipo de GAG é comum em análises de tecido cartilaginoso descelularizado.

Além de avaliar a MEC quanto a presença de GAG sulfatada, realizamos análises relacionadas a detecção de moléculas não sulfatadas, com o ácido. A partir de imagens 8 bit observamos que o tecido descelularizado apresentava valor ligeiramente superior de GAG não sulfatado quando comparado ao tecido nativo ($4,93 \mu\text{m}^2$ vs. $5,88 \mu\text{m}^2$). Após a aplicação do índice de retração tecidual observamos sugestível redução deste tipo molecular no tecido descelularizado ($3,62 \mu\text{m}^2$).

Em nosso estudo, além de análises semi-quantitativa por colorações histoquímicas, realizamos análise qualitativa de glicoproteínas totais por histoquímica de PAS e da glicoproteína fibronectina através de marcação imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-fibronectina. Em análise histoquímica de PAS, observamos a presença de carboidratos totais em tecido controle e a presença de glicoproteínas de matriz evidente no tecido descelularizado. Em análise imuno-histoquímica para glicoproteína fibronectina, observamos discreta marcação no tecido controle e intensa no descelularizado. A glicoproteína total e fibronectina demonstram ser mais evidentes no tecido descelularizado, e isso pode ser explicado também pela falta de células e a consequente exposição de vários níveis da ECM.

O SDS é o agente descelularizante de escolha para a obtenção de um andaime acelular devido a sua grande capacidade em remover material celular até mesmo em baixas concentrações (FRIEDRICH et al., 2017). Apesar de sua importância e seu alto rendimento, o detergente é tóxico e possui facilidade em impregnar-se na ECM tornando-o difícil de ser removido. Além disso, a presença residual de SDS pode levar a morte celular, além de resposta imunitária do hospedeiro em uma futura aplicação terapêutica dos produtos descelularizados (FRIEDRICH et al., 2017). Em nosso estudo, para a remoção do detergente residual, realizamos ao fim de nossa

abordagem de descelularização sucessivas etapas de lavagem em água destilada e aplicamos uma baixa rotação em um agitador orbital. Nós avaliamos a concentração de SDS presente no interior do andaime descelularizado a partir de desintegração tecidual realizada com auxílio de equipamento de ultrassom. Analisamos as alíquotas do tecido desintegrado que passaram por etapas de lavagem, e observamos que a quantidade de SDS encontrada foi de aproximadamente 0,01129% (1,267 mg). Como controle positivo, utilizamos amostras de tecido desintegrado que não passaram pelas sucessivas etapas de lavagens de água destilada, e encontramos valor médio de 0,01826 % (1,958 mg). Nosso método de remoção de SDS foi capaz de reduzir aproximadamente 38,2% da concentração encontrada na pré-lavagem (FIG. 28). GRATZER et. al. (2006) avaliaram a toxicidade de SDS em fibroblastos suínos e observaram que valores de SDS entre 0,44 mg/ml e 1,38 mg/ml em meio de cultivo não foram citotóxicos para esse tipo celular (GRATZER; HARRISON; WOODS, 2006). Em nossa análise encontramos valor médio de SDS de 1,267 mg/ml (0,01129 %), próximo ao encontrado relatado por GRATZER, et. al. (2006). No entanto ZVAROVA et. al. (2016) realizaram análise de citotoxicidade do SDS em células pulmonares e observaram que a presença de concentrações de detergente >0,002% possuía efeito negativo sobre essas populações (ZVAROVA et al., 2016).

A partir de ECM acelular devidamente avaliada quanto a sua estrutura, composição molecular e química nós realizamos procedimento de recelularização utilizando *pool* celular cardíaco neonatal. Semeamos média $2,16 \times 10^5$ células por ECM descelularizada e as mantivemos em cultura por 7 dias e em seguida, em análise histoquímica por HE observamos a presença de conglomerados celulares núcleos visíveis (FIG. 29A e 29B; FIG. 30). Além disso, observamos ainda células com morfologia espalhada apresentando estrias bastante típica de célula muscular cardíaca (FIG. 31). Em nosso procedimento, obtivemos menor quantidade de células viáveis ($2,16 \times 10^5$ contra $4,0 \times 10^5$ e do que GARRY et. al. (2016) (GARRY; KREN; GARRY, 2016; SILVA et al., 2016), no entanto, conseguimos demonstrar microscopicamente a presença de células aderidas ao andaime acelular.

Ao longo dos anos, ECM descelularizada e biomateriais foram implantados *in vivo* para avaliar o reparo tecidual e o seu potencial de desencadear resposta imunológica. Houveram relatos de integração completa da ECM por organismo hospedeiro, bem

como relatos de resposta do corpo estranho aos materiais, inflamação crônica e encapsulamento (AAMODT; GRAINGER, 2016). A ocorrência de resposta imune e a sua intensidade está correlacionada diretamente as características e propriedades do material implantado, incluindo a espessura, porosidade e composição (MADDEN et al., 2010; WARD et al., 2002).

Partindo de uma ECM descelularizada e hipoteticamente não citotóxica, a biocompatibilidade é uma questão importante a ser esclarecida, visto que é capaz de fornecer informações sobre a pureza e a atividade imunológica do arcabouço acelular. Buscamos avaliar se possíveis resquícios de material genético, elementos químicos e moléculas proteicas e não proteicas presentes na ECM descelularizada seriam capazes de evocar uma resposta imune. Implantamos ECM descelularizada no tecido subcutâneo da orelha de camundongos adultas fêmeas imunocompetentes. Acompanhamos macroscopicamente durante 28 dias e notamos leve rubor local nos sete primeiros dias pós-cirurgia.

Em contagem de leucócitos totais e diferenciais realizadas em cinco períodos distintos – 0, 7º, 14º, 21º e 28º dias –. Observamos aparente leucocitose a partir do sétimo dia em todos os grupos experimentais. Acompanhando o índice de leucócitos totais, foram encontrados valores superiores de neutrófilos no mesmo período. Nos grupos falso operado e implante, o número de leucócitos totais e neutrófilos tendiam a normalizar-se a partir do 14º dia do pós-cirúrgico. Na contramão, o grupo implante nativo apresentou valores elevados de leucócitos e neutrófilos até a última análise.

A contagem diferencial de linfócitos evidenciou alterações cuja relação era diretamente proporcional a contagem de neutrófilos totais, visto que a contagem realizada é proporcional.

Em análise histológica por coloração histoquímica de HE, observamos as características normais do grupo controle negativo. O grupo Sham apresentou visualmente as mesmas características do grupo controle negativo, evidenciando características possivelmente normais. A análise no grupo com MEC descelularizada implantada, verificamos que a mesma parecia estar incorporada ao tecido do hospedeiro, além disso, pudemos observar a presença de infiltração de células

hospedeiras e sugerível neovascularização com a presença de capilares. Através da histoquímica por picro-sirius e alcian blue pH 0,5 observamos no tecido descelularizado a presença de sugestíveis áreas de condrogênese, sugerindo a possibilidade da indução de migração celular pela ECM descelularizada implantada. No tecido descelularizado implantado não foi discernível a presença de exsudato inflamatório. O grupo implantado com tecido nativo apresentou intensa atividade inflamatória com a presença de incontáveis células imunológicas (neutrófilos, macrófagos e plasmócitos).

MAZZA et. al. (2016) realizaram teste de biocompatibilidade implantando cubos de ECM descelularizada de fígado humano em tecido subcutâneo e omento de camundongos adultos, avaliaram entre o sétimo e vigésimo primeiro dia e encontram resultados semelhantes aos encontrados em nosso estudo. Observaram ser comum a ocorrência de resposta inflamatória até o sétimo dia devido ao trauma cirúrgico, mas, no entanto, essa resposta tendia a se dissipar com o passar dos dias, além disso, a morfologia do tecido descelularizado implantado assemelhou-se a morfologia observada em nosso estudo .(MAZZA et al., 2015)

7. CONCLUSÃO

Os achados em nosso estudo demonstraram que nossa abordagem descelularizante desenvolvida para modelo experimental neonatal foi eficaz em remover intimamente o conteúdo celular e 98,5% do material genético. Demonstramos a redução da concentração de SDS residual em amostras com nosso protocolo de lavagem. Os valores encontrados podem ser considerados não tóxicos de acordo com a literatura, no entanto, é necessário a realização de um ensaio de citotoxicidade para corroborar nossos resultados encontrados. Evidenciamos ainda que a ECM descelularizada não foi capaz de induzir infiltração leucocitária ao serem implantadas em subcutâneo de camundongos imunocompetentes.

Demonstramos a manutenção de elementos de matriz extracelular como colágeno, glicosaminoglicanos e glicoproteínas. Realizamos análises semi-quantitativa e demonstramos a manutenção de colágeno tipo I, além de glicosaminoglicano sulfatado. Não observamos manutenção de glicosaminoglicano não sulfatado. Qualitativamente nós observamos a presença de glicoproteína total e da glicoproteína fibronectina. Quantitativamente, evidenciamos a manutenção de colágeno em tecido controle e descelularizado através da dosagem de hidroxiprolina, importante aminoácido presente na estrutura das moléculas colágenas. Avaliamos o teor de sulfato de condroitina, importante GAG estrutural e funcional e evidenciamos que a mesma foi reduzida em nosso tecido descelularizado.

A microscopia eletrônica de transmissão permitiu que pudéssemos avaliar a ECM descelularizada a partir de seu microambiente. Nós observamos a presença intensa de fibras colágenas e ausência de detritos celulares. A microscopia eletrônica de varredura evidenciou como esperado, que o processo de descelularização é capaz de levar retração tecidual devido a remoção de células.

Em nossa recelularização evidenciamos através de coloração com HE a presença de grupamentos celulares aderidos à ECM. Futuramente a realização de marcação imuno-histoquímica, microscopia eletrônica de transmissão e varredura poderá

acrescentar informações preciosas no que diz respeito a adesão e proliferação celular na ECM.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAMODT, J. M.; GRAINGER, D. W. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. **Biomaterials**, v. 86, p. 68–82, abr. 2016.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. [s.l: s.n.]. v. 53

ARENAS-HERRERA, J. E. et al. Decellularization for whole organ bioengineering. **Biomedical materials (Bristol, England)**, v. 8, n. 1, p. 14106, 1 fev. 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS. **Registro Brasileiro de Transplantes**. Brazil: [s.n.].

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS. **Registro Brasileiro de Transplantes**. [s.l: s.n.].

BACAL, F. II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, p. 16–73, 2009.

BADYLAK, S. F.; TAYLOR, D.; UYGUN, K. Whole Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds (FALA SOBRE RECELULARIZAÇÃO COM INJEÇÃO DE CÉLULAS). **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 13, p. 110301095218061, 2010.

BAIGUERA, S. et al. Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation. **Biomaterials**, v. 31, n. 34, p. 8931–8938, 2010.

BAKER, S. C.; SOUTHGATE, J. Towards control of smooth muscle cell differentiation in synthetic 3D scaffolds. **Biomaterials**, v. 29, n. 23, p. 3357–3366, ago. 2008.

BISSELL, M. J.; HALL, H. G.; PARRY, G. How does the extracellular matrix direct gene expression? **Journal of theoretical biology**, v. 99, n. 1, p. 31–68, 7 nov. 1982.

BOUDREAU, N.; MYERS, C.; BISSELL, M. J. From laminin to lamin: regulation of tissue-specific gene expression by the ECM. **Trends in cell biology**, v. 5, n. 1, p. 1–4, jan. 1995.

BROWN, B. N. et al. Surface characterization of extracellular matrix scaffolds. **Biomaterials**, v. 31, n. 3, p. 428–437, 2010.

BROWN, B. N.; BADYLAK, S. F. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. **Translational Research**, v. 163, n. 4, p. 268–285, 2014.

BRUFORD, M. et al. Singlelocus and multilocus DNA fingerprint. In: HOELZEL, A. R. (Ed.). . **Molecular Genetic Analysis of Populations: A practical Approach**. 2th^a ed. Oxford: IRL Press at Oxford University Press, 1998, 1992. p. 225–270.

CAMPBELL, I. D.; HUMPHRIES, M. J. Integrin structure, activation, and interactions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 3, 1 mar. 2011.

CEBOTARI, S. et al. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. **Artificial organs**, v. 34, n. 3, p. 206–10, mar. 2010.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–43, abr. 2011.

CREE CHAMBERLAND, ALMUDENA MARTINEZ-FERNANDEZ, ROSANNA BERARDI, AND T. J. N. Embryonic Decellularized Cardiac Scaffold Supports Embryonic Stem Cell Differentiation to Produce Beating Cardiac Tissue. **Stem Cells Volume 2014 (2014)**, v. 2014, n. 625164, p. 10, 2014.

DE ROBERTIS, E.; HIB, J. **Fundamentos de Biología Celular y Molecular**. 4. ed. [s.l.] El Ateneo, 2004.

ELDER, B. D.; ELESWARAPU, S. V.; ATHANASIOU, K. A. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. **Biomaterials**,

v. 30, n. 22, p. 3749–3756, 2009.

FRIEDRICH, E. E. et al. Residual sodium dodecyl sulfate in decellularized muscle matrices leads to fibroblast activation in vitro and foreign body response in vivo. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, n. August, p. 1–12, 2017.

FU, J. et al. An optimized protocol for culture of cardiomyocyte from neonatal rat. n. 2005, p. 109–116, 2006.

FU, R.-H. et al. Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering. **Cell transplantation**, v. 23, n. 4–5, p. 621–30, jan. 2014.

FUNAKOSHI, S. et al. Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 19111, 8 maio 2016.

GARRY, M. G.; KREN, S. M.; GARRY, D. J. Neonatal Cardiac Scaffolds: Novel Matrices for Regenerative Studies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 117, 5 nov. 2016.

GILBERT, T. W.; SELLARO, T. L.; BADYLAK, S. F. Decellularization of tissues and organs. (FALA SOBRE AGITAÇÃO). **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675–83, jul. 2006.

GILLIES, A. R. et al. Method for Decellularizing Skeletal Muscle Without Detergents or Proteolytic Enzymes. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 17, n. 4, p. 383–389, abr. 2011.

GORDON, M. K.; HAHN, R. A. Collagens. **Cell and Tissue Research**, v. 339, n. 1, p. 247–257, 20 jan. 2010.

GRATZER, P. F.; HARRISON, R. D.; WOODS, T. Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix. **Tissue engineering**, v. 12, n. 10, p. 2975–2983, 2006.

GRAUSS, R. et al. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 27, n. 4, p. 566–571, abr. 2005.

GUO, S.-Z. et al. Preparation of the acellular scaffold of the spinal cord and the study of biocompatibility. **Spinal cord**, v. 48, n. 7, p. 576–81, jul. 2010.

GUYETTE, J. P. et al. Perfusion decellularization of whole organs. **Nature protocols**, v. 9, n. 6, p. 1451–68, 2014.

GUYETTE, J. P. et al. Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix Novelty and Significance. **Circulation Research**, v. 118, n. 1, p. 56–72, 8 jan. 2016.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. [s.l.] Elsevier, 2006.

HE, M.; CALLANAN, A. Comparison of methods for whole organ decellularisation in tissue engineering of bio-artificial organs. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 19, n. 3, p. 121019070753008, 2012.

HILL, R. C. et al. Quantification of Extracellular Matrix Proteins from a Rat Lung Scaffold to Provide a Molecular Readout for Tissue Engineering. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 14, n. 4, p. 961–973, 2015.

HOGAN, M. et al. Establishing the Framework to Support Bioartificial Heart Fabrication Using Fibrin-Based Three-Dimensional Artificial Heart Muscle. **Artificial Organs**, v. 39, n. 2, p. 165–171, fev. 2015.

HREBIKOVA, H.; DIAZ, D.; MOKRY, J. Chemical decellularization: a promising approach for preparation of extracellular matrix. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia**, out. 2013.

HSIEH, P. C. H. et al. ENDOTHELIAL-CARDIOMYOCYTE INTERACTIONS IN CARDIAC DEVELOPMENT AND REPAIR. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n.

1, p. 51–66, jan. 2006.

HUMPHREY, J. D.; DUFRESNE, E. R.; SCHWARTZ, M. A. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 802–812, 22 out. 2014.

HUYNH, M. B. et al. Age-related changes in rat myocardium involve altered capacities of glycosaminoglycans to potentiate growth factor functions and heparan sulfate-altered sulfation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 14, p. 11363–11373, 2012.

HYNES, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science (New York, N.Y.)**, v. 326, n. 5957, p. 1216–9, 27 nov. 2009.

ICARDO, J. M.; COLVEE, E. Atrioventricular valves of the mouse: III. Collagenous skeleton and myotendinous junction. **The Anatomical Record**, v. 243, n. 3, p. 367–375, nov. 1995.

INAMDAR, A.; INAMDAR, A. Heart Failure: Diagnosis, Management and Utilization. **Journal of Clinical Medicine**, v. 5, n. 12, p. 62, 29 jun. 2016.

INGBER, D. Extracellular matrix and cell shape: Potential control points for inhibition of angiogenesis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 236–241, nov. 1991.

JALILI-FIROOZINEZHAD, S. et al. Influence of decellularized pericardium matrix on the behavior of cardiac progenitors. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 14, p. n/a-n/a, 10 abr. 2016.

JESTY, S. A et al. in the Neonatal , But Not Adult , Heart. p. 4–9, 2012.

JOHNSON, T. D. et al. Quantification of decellularized human myocardial matrix: A comparison of six patients. **PROTEOMICS - Clinical Applications**, v. 10, n. 1, p. 75–83, jan. 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. [s.l: s.n.].

KADLER, K. E. et al. Collagens at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 12, p. 1955–1958, 22 maio 2007.

KARABEKMEZ, F. E.; DUYNAMAZ, A.; MORAN, S. L. Early clinical outcomes with the use of decellularized nerve allograft for repair of sensory defects within the hand. **Hand (New York, N.Y.)**, v. 4, n. 3, p. 245–9, set. 2009.

KARLSSON, M.; BJÖRNSSON, S. Quantitation of Proteoglycans in Biological Fluids Using Alcian Blue. In: **Proteoglycan Protocols**. New Jersey: Humana Press, 2001. p. 159–173.

KEANE, T. J. et al. Preparation and characterization of a biologic scaffold from esophageal mucosa. **Biomaterials**, v. 34, n. 28, p. 6729–37, set. 2013.

KEANE, T. J.; SWINEHART, I. T.; BADYLAK, S. F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 84, p. 25–34, ago. 2015.

KITAHARA, H. et al. Heterotopic transplantation of a decellularized and recellularized whole porcine heart. **Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery**, p. ivw022, 2016.

LEONARD, B. L.; SMAILL, B. H.; LEGRICE, I. J. Structural Remodeling and Mechanical Function in Heart Failure. **Microscopy and Microanalysis**, v. 18, n. 1, p. 50–67, 18 fev. 2012.

LIAO, J.; JOYCE, E. M.; SACKS, M. S. Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet. **Biomaterials**, v. 29, n. 8, p. 1065–1074, 2008.

LISTER, Z.; RAYNER, K. J.; SUURONEN, E. J. How Biomaterials Can Influence Various Cell Types in the Repair and Regeneration of the Heart after Myocardial Infarction. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 4, p. 62, 18 jul.

2016.

LOCKHART, M. et al. Extracellular Matrix and Heart Development. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 91, n. 6, p. 535–550, 2011a.

LOCKHART, M. et al. Extracellular matrix and heart development. **Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology**, v. 91, n. 6, p. 535–50, jun. 2011b.

LONDONO, R.; BADYLAK, S. F. Biologic scaffolds for regenerative medicine: mechanisms of in vivo remodeling. **Annals of biomedical engineering**, v. 43, n. 3, p. 577–92, mar. 2015.

LU, T.-Y. et al. Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. **Nature Communications**, v. 4, p. 1–11, jan. 2013.

MADDEN, L. R. et al. Proangiogenic scaffolds as functional templates for cardiac tissue engineering. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 34, p. 15211–15216, 2010.

MAZZA, G. et al. Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–15, 2015.

METHE, K. et al. An Alternative Approach to Decellularize Whole Porcine Heart. **BioResearch Open Access**, v. 3, n. 6, p. 327–338, 2014.

MINICUCCI, M. F. et al. Heart Failure After Myocardial Infarction: Clinical Implications and Treatment. **Clinical Cardiology**, v. 34, n. 7, p. 410–414, jul. 2011.

MOSER, P. T.; OTT, H. C. Recellularization of organs. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 19, n. 6, p. 603–609, 2014.

OMS. **Top 10 causes of death worldwide**. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>.

OTT, H. C. et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. (RECELULARIZAÇÃO). **Nature medicine**, v. 14, n. 2, p. 213–21, fev. 2008.

OTT, H. C. et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. **Nature medicine**, v. 16, n. 8, p. 927–33, ago. 2010.

PALAZZOLO, G. et al. Cardiac Niche Influences the Direct Reprogramming of Canine Fibroblasts into Cardiomyocyte-Like Cells. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–13, 2016.

PARMAKSIZ, M. et al. Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine. **Biomedical materials (Bristol, England)**, v. 11, n. 2, p. 22003, jan. 2016.

POLIZZOTTI, B. D. et al. Stimulation of cardiomyocyte regeneration in neonatal mice and in human myocardium with neuregulin reveals a therapeutic window. v. 7, n. 281, p. 1–30, 2017.

PORRELLO, E. R. et al. Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart. **Science**, v. 331, n. 6020, p. 1078–1080, 25 fev. 2011.

PORRELLO, E. R.; OLSON, E. N. A neonatal blueprint for cardiac regeneration. **Stem Cell Research**, v. 13, n. 3, p. 556–570, 2014.

POSS, K. D. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 10, p. 710–722, 14 out. 2010.

REING, J. E. et al. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. **Biomaterials**, v. 31, n. 33, p. 8626–33, nov. 2010.

REMLINGER, N. T.; WEARDEN, P. D.; GILBERT, T. W. Procedure for decellularization of porcine heart by retrograde coronary perfusion. **Journal of**

visualized experiments : JoVE, n. 70, p. e50059, 2012.

ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. **Developmental Biology**, v. 341, n. 1, p. 126–140, 1 maio 2010.

SCHOPKA, S. et al. Recellularization of biological heart valves with human vascular cells: In vitro hemocompatibility assessment. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 88, n. 1, p. 130–138, 2009.

SHIRAKIGAWA, N.; HIROYUKI, I. Decellularized Tissue Engineering. In: TRIPATHI, A.; MELO, J. S. (Eds.). . **Advances in Biomaterials for Biomedical Applications**. Advanced Structured Materials. Singapore: Springer Singapore, 2017. v. 66p. 553.

SILVA, A. C. et al. Three-dimensional scaffolds of fetal decellularized hearts exhibit enhanced potential to support cardiac cells in comparison to the adult. **Biomaterials**, v. 104, p. 52–64, 2016.

SKALAK, R.; FOX, C. F. Tissue Engineering, Proceedings for a Workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, 26-29 Feb. **Alan Liss, New York**, 1988.

SMITH, S. C. Multiple Risk Factors for Cardiovascular Disease and Diabetes Mellitus. **The American Journal of Medicine**, v. 120, n. 3, p. S3–S11, mar. 2007.

SOUZA, R. S. DE; PINHAL, M. A. D. S. Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v. 36, n. 1, p. 48–54, 2011.

SPECTOR, M. Decellularized tissues and organs: an historical perspective and prospects for the future. **Biomedical Materials**, v. 11, n. 2, p. 20201, 17 mar. 2016.

THEOCHARIS, A. D. et al. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. **FEBS Journal**, v. 277, n. 19, p. 3904–3923, out. 2010.

THEOCHARIS, A. D. et al. Insights into the key roles of proteoglycans in breast cancer biology and translational medicine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1855, n. 2, p. 276–300, abr. 2015.

THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, fev. 2016.

TORRE, J. C. DE M. DELLA; LICHTIG, J.; BERAQUET, N. J. Validação do método espectrofotométrico para quantificação do aminoácido hidroxiprolina em conservas de carne Spectrophotometric method validation for hydroxyproline amino acid determination in canned meat. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 63, n. 1, p. 35–42, 2004.

UYGUN, B. E. et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. **Nature medicine**, v. 16, n. 7, p. 814–20, jul. 2010.

VALIENTE-ALANDI, I.; SCHAFER, A. E.; BLAXALL, B. C. Journal of Molecular and Cellular Cardiology Extracellular matrix-mediated cellular communication in the heart. v. 91, p. 228–237, 2016.

VUNJAK-NOVAKOVIC, G. et al. Bioengineering heart muscle: a paradigm for regenerative medicine. **Annual review of biomedical engineering**, v. 13, p. 245–267, 2011.

WARD, W. K. et al. The effect of microgeometry, implant thickness and polyurethane chemistry on the foreign body response to subcutaneous implants. **Biomaterials**, v. 23, n. 21, p. 4185–4192, nov. 2002.

WHITE, L. J. et al. The impact of detergents on the tissue decellularization process: A ToF-SIMS study. **Acta Biomaterialia**, v. 50, p. 207–219, 2017.

WICKSTRÖM, S. A.; RADOVANAC, K.; FÄSSLER, R. Genetic analyses of integrin signaling. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 2, p. a005116, 1 fev. 2011.

WILLIAMS, C. et al. Young developmental age cardiac extracellular matrix promotes the expansion of neonatal cardiomyocytes in vitro. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 1, p. 194–204, 2014.

WINSLOW, R. L.; WALKER, M. A.; GREENSTEIN, J. L. Modeling calcium regulation of contraction, energetics, signaling, and transcription in the cardiac myocyte. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 37–67, jan. 2016.

WU, L. L. Review of risk factors for cardiovascular diseases. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 29, n. 2, p. 127–33, 1999.

XIN, M.; OLSON, E. N.; BASSEL-DUBY, R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 8, p. 529–541, 2013.

YOUNGSTROM, D. W. et al. Functional Characterization of Detergent-Decellularized Equine Tendon Extracellular Matrix for Tissue Engineering Applications. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

ZVAROVA, B. et al. Residual Detergent Detection Method for Nondestructive Cytocompatibility Evaluation of Decellularized Whole Lung Scaffolds. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 22, n. 5, p. 418–428, 2016.

9. ANEXOS




UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICATE

We certify that the Protocol 42/2016 related to research project entitled "Decellularization and recellularization of rodent organs for Development of Functional Bioartificial Organs", under responsibility of Breno Valentim Nogueira, is in accordance with the ethical principles of animal experimentation adopted by this Ethics Committee on Animal Use (CEUA-UFES), being approved at the regular assembly in October 07, 2016.

Vitória (ES), October 07, 2016.


Prof. Roger Lyrio dos Santos
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/CCS/UFES